

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

---

**Studijní program: Chemie**

**Studijní obor: Chemie životního prostředí**



**Bc. Sandra Stachová**

**Vliv dominantní dřeviny a zrnitosti substrátu na složení  
mikrobiálního společenstva studovaného pomocí PLFA**

The influence of the dominant trees and grain substrate the composition of the  
microbial community studied by PLFA

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: prof. Mgr. Ing. Jan Frouz, CSc.

Konzultant: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2016



## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03. srpna 2016

Podpis: .....



## ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo provedení analýzy půdních mikrobiálních společenstev tří ekologicky odlišných lokalit, cca 25 let starých, lesnický rekultivovaných, výsypek v Polské republice, a to konkrétně výsypky hnědouhelného lomu Bełchatów a pískoven Piaseczno a Szczakowa. Účelem analýz bylo vyhodnocení míry závislosti složení mikrobiálních společenstev na různé zrnitosti substrátu a na dominantní dřevině v jednotlivých lokalitách. Dominantními dřevinami byly porosty břízy bělokoré (*Betula pendula*), borovice lesní (*Pinus silvestris*), dubu letního (*Quercus robur*) a olše lepkavé (*Alnus glutinosa*). Analýza půdních mikrobiálních společenstev byla provedena metodou vyhodnocování specifických fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) mikroorganismů, která je nejvhodnějším způsobem provedení relativně rychlé analýzy velkého množství vzorků, neboť PLFA jsou extrahovatelné a fungují jako biomarkery indikující přítomnost a množství mikroorganismů (hub, G- a G+ bakterií, aktinobakterií apod.) a umožňují tak kvalitativní a kvantitativní zhodnocení celých mikrobiálních společenstev. Analýza PLFA umožňuje pomocí celkové koncentrace PLFA detekovat v půdě živou mikrobiální biomasu. Celkem bylo analyzováno 66 vzorků půd, z toho 33 z Oe vrstvy a 33 z A vrstvy vždy ve 3 replikacích, tedy na každé lokalitě pod každou stromovou monokulturou byly odebrány 3 vzorky, přičemž na lokalitách Bełchatów a Szczakowa pod všemi výše uvedenými druhy. V lokalitě Piaseczno nejsou přítomny porosty olše. Z odebraných vzorků byly extrahovány lipidy, které byly v dalším kroku frakcionovány, transesterifikovány a nakonec analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (GC/MS). Data byla statisticky vyhodnocena v programu Canoco a Statistica. Oproti původní hypotéze závislosti složení mikrobiálních společenstev na zrnitosti půdního substrátu a vlivu dominantní dřeviny z výsledků analýzy vyplývá, že složení mikrobiálního společenstva ze všech rekultivovaných lokalit závisejí především na vertikální stratifikaci půdního horizontu. Významnější vliv rekultivačních dřevin či zrnitosti substrátu nebyl prokázán. Tímto se lokality odlišují od nerektivovaných sukcesních lokalit.

### Klíčová slova:

PLFA, půdní mikrobiální společenstva, mikroorganismy, bakterie, houby, dekompozice, C/N poměr, rekultivace, rekultivační dřeviny, výsypky, půdní horizonty, GC/MS



## ABSTRACT

The aim of the thesis was to analyze soil microbial communities of three ecologically different locations, about 25 years old, forestry reclaimed dumps in the Republic of Poland, namely dumps of brown coal mine Bełchatów and sand mines Piaseczno and Szczakowa. I evaluated the degree of dependence of structure and composition of these communities on various substrate grain sizes and the influence of the dominant tree species. These were stands of birch (*Betula pendula*), pine (*Pinus silvestris*), oak (*Quercus robur*) and alder (*Alnus glutinosa*). Analysis of soil microbial communities was made by evaluating specific phospholipid fatty acids (PLFA) of microorganisms. It is the most appropriate way to implement the relatively rapid analysis of large numbers of samples, since PLFA are easily extractable and act as biomarkers indicating the presence of a number of different microorganisms (fungi, G- and G + bacteria, Actinobacteria, etc.) and thus allowing a qualitative and quantitative assessment of whole microbial communities. PLFA analysis enables to detect a total concentration of PLFA only in living soil microbial biomass. I analyzed 66 soil samples, 33 from an Oe layer and 33 from an A layer, every in three replications, i.e. three replications were collected at each location below each tree monoculture, except for Piaseczno sand mine dump where alder is not presented. Lipids were extracted, fractionated, transesterified and finally analyzed using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS). The obtained data were analyzed using statistical programs Canoco and Statistica. Contrary to the original hypothesis that composition and structure of microbial communities depend on the substrate grain size and the dominant tree species, the results indicated that the composition of microbial communities expressed by PLFA values depended especially on vertical stratification of the soil horizons. A significant effect of individual tree stands or grain size of substrate has not been demonstrated. This is in contradiction to successional habitats.

## Keywords:

PLFA, soil microbial communities, microorganisms, bacteria, fungi, decomposition, C/N ratio, land reclamation, land reclamation trees, dump, soil horizons, GC/MS





## OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>I. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>15</b>
<b>1 STRUKTURA A FUNKCE PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY .....</b>	<b>17</b>
1.1 Půdní mikrobiální biomasa .....	17
1.1.1 Složení a struktura půdních mikrobiálních společenstev .....	18
1.1.2 Mikrobiální aktivita a respirace půdy .....	19
1.1.3 Význam půdních mikrobiálních společenstev .....	21
1.2 Dekompozice a mikrobiální společenstva .....	22
1.2.1 Vliv teploty, záření, vlhkosti a pH půdy na rychlost dekompozice .....	23
1.2.2 Složení opadu a poměr C/N .....	24
1.2.3 Působení ostatních půdních organizmů .....	25
1.3 Hodnocení půdních mikrobiálních společenstev .....	26
1.3.1 Analýza společenstva - kultivační metody .....	27
1.3.2 Analýza společenstva - kultivačně nezávislé metody .....	28
1.3.3 Metody založené na posouzení velikosti SMB .....	30
<b>2 SUKCESE, REKULTIVACE A TVORBA PŮDY NA VÝSYPKÁCH .....</b>	<b>32</b>
2.1 Sukcese a rekultivace na výsypkách .....	32
2.1.1 Lesnická rekultivace .....	33
2.1.2 Rekultivační dřeviny .....	34
2.1.3 Vliv rekultivačních dřevin na vývoj a vlastnosti půd .....	35
2.2 Tvorba půd na výsypkách a jejich vlastnosti .....	36
2.2.1 Zvětrávání výsypkových substrátů .....	37
2.2.2 Půdní organická hmota a její význam .....	37
2.2.3 Akumulace organické hmoty na výsypkách .....	38
2.2.4 Formy humusu .....	39

<b>3</b>	<b>MASTNÉ KYSELINY</b>	42
3.1	Klasifikace mastných kyselin	42
3.2	Názvosloví mastných kyselin	42
3.3	Fosfolipidové mastné kyseliny (PLFA)	43
3.3.1	<i>Dělení fosfolipidových mastných kyselin</i>	43
3.3.2	<i>Bakteriální PLFA</i>	44
3.3.3	<i>Houbové PLFA</i>	46
3.3.4	<i>Analýza půdních mikrobiálních společenstev pomocí PLFA</i>	47
3.3.5	<i>Limitace analýzy PLFA</i>	48
3.3.6	<i>Využití analýzy PLFA v jiných studiích</i>	49
<b>II.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	51
<b>4</b>	<b>METODIKA</b>	53
4.1	Charakterizace odběrových míst	53
4.2	Odběr, zpracování a stanovení vzorků půd	54
4.2.1	<i>Příprava vzorků k analýze - extrakce lipidů</i>	54
4.2.2	<i>Fracionace lipidů ze vzorku pomocí SPE</i>	55
4.2.3	<i>Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace)</i>	55
4.2.4	<i>Analýza vzorků pomocí GC/MS</i>	55
4.2.5	<i>Stanovení ostatních chemických parametrů půdy</i>	56
4.2.6	<i>Statistické vyhodnocení dat</i>	56
4.3	Chemikálie	56
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	57
5.1	Vyhodnocení výsledků	57
5.2	Diskuze	68
	<b>ZÁVĚR</b>	70
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	71
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	72
	<b>SEZNAM TABULEK</b>	72
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	73





## ÚVOD

Teoretická část práce má za cíl, ve třech kapitolách rešerše, představit problematiku klasifikace a diverzifikace půdních mikrobiálních společenstev, sukcečních i rekultivovaných výsypek, s ohledem na jejich strukturu, funkci a fyzikálně-chemické a biologické faktory, ovlivňující jejich růst a složení. Jsou diskutovány metody jejich analýzy, především pomocí metody fosfolipidových mastných kyselin (PLFA). První kapitola se nejprve věnuje složení a strukturně-funkčním vlastnostem mikrobiálních společenstev, faktorům prostředí, které je ovlivňují, jejich aktivitě a půdní respiraci, jakožto měřítku pro hodnocení a jejich významu pro půdní ekosystém, zejména prostřednictvím procesu dekompozice, v němž hraje důležitou roli také složení opadu, poměr C/N a spolupůsobení ostatních půdních organismů. První kapitolu uzavírá přehled metod používaných k hodnocení půdních mikrobiálních společenstev. S ohledem na předmět studia této práce je ve druhé kapitole popsán průběh sukcese a rekultivace výsypek, zejména rekultivace lesnické, rekultivačních dřevin k nim používaných a jejich vlivu na tvorbu půdy, která je především ovlivněna zvětráváním výsypkových substrátů, akumulaci půdní organické hmoty a vzniku humusového horizontu v kontextu vlivu mikrobiálních společenstev na tyto procesy. Rešerši uzavírá třetí kapitola, pojednávající o problematice PLFA, jejichž pomocí byla v této práci mikrobiální společenstva hodnocena. Stručně vysvětluje jejich klasifikaci, názvosloví a dělení. Stěžejní částí kapitoly je popis analýzy půdních mikrobiálních společenstev na základě stanovení PLFA, popis limitů metody i využití v dřívějších studiích.

Experimentální část této diplomové práce popisuje provedení analýzy mikrobiálních společenstev ve vzorcích půd odebraných na lesnicky rekultivovaných výsypkách polského hnědouhelného dolu a dvou pískoven pomocí metody PLFA za účelem zjištění vlivu složení substrátu a také dominantní dřeviny na tato společenstva. Kromě těchto faktorů byla také věnována pozornost závislosti na půdním horizontu. Hypotézy diplomové práce byly stanoveny takto: (1) Zrnitostní složení půd má vliv na složení mikrobiálního společenstva. Tato hypotéza vyplývá z předpokladu, že zrnitostní složení (v mém případě různé zastoupení písku a jílu) vytváří odlišné podmínky prostředí, jakými je např. obsah vody nebo kyslíku v půdě. (2) Dominantní dřevina má vliv na složení mikrobiálního společenstva. Tato hypotéza je postavena na faktu, že vybrané dřeviny se liší kvalitou opadu, který je hlavním zdrojem uhlíku a živin pro mikrobiální společenstva. (3) Půdní horizont má vliv na složení mikrobiálního společenstva. Zatímco Oe horizont je tvořen především rozkládajícím se opadem, A horizont je tvořen směsí rozložené organické hmoty a půdního substrátu. Odlišné podmínky mohou ovlivňovat, jaká společenstva dominují v tom kterém horizontu. Analýza vzorků sestávala z extrakce lipidů, jejich následné frakcionace a mírně alkalické methanolýzy (transesterifikace) a stanovení na GC/MS. Statistické vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Canoco a Statistica. Byla použita jednofaktorová ANOVA, Tukey test, PCA a RDA. Výsledky práce budou součástí mezinárodního výzkumného projektu prováděného ve spolupráci UK a University Life Sciences v Krakově za účelem zvýšení efektivity rekultivačního procesu.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**





# 1 STRUKTURA A FUNKCE PŮDNÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY

## 1.1 Půdní mikrobiální biomasa

Půda, tvořená půdními typy s výraznou vertikální stratifikací na tzv. půdní horizonty o různém složení, obecně tvořenými směrem od povrchu organickým (humusovým) horizontem, po němž následuje minerální horizont a dále půdotvorný substrát a matečná hornina, je životním prostředím značného množství půdních organismů, souhrnně označovaných jako edafon, které se podle jejich velikosti dělí na megaedafon, jehož zástupci, např. žížaly, jsou větší než 20 mm, dále makroedafon o velikosti od 2 do 20 mm, k němuž je řazen hmyz, mezoedafon v rozmezí velikostí 0,1 - 2 mm, do něhož náleží např. chvostoskoci, ale i houby a nakonec mikroedafon, k němuž náleží mikroorganismy o velikosti pod 0,2 mm, tedy prvoci, řasy, bakterie a mikromycety [83,167].

Půdní mikrobiální biomasou, (SMB – Soil Microbial Biomass), se rozumí všechny živé mikroorganismy v dané jednotce půdy, tvořící druhově diverzifikovaná a dynamická společenstva, využívající ke svému růstu odlišné zdroje a plnící různé funkce, především umožňují rozklad čerstvého i již přítomného organického substrátu a produktů jeho prvotního rozkladu, která se odlišují rychlostí růstu a velikostí samotných buněk [83,167].

Půdní mikrobiální biomasa ovlivňuje vlastnosti půdy a tím i produktivitu rostlin biochemickými transformacemi látek v půdě. Charakterizace struktury a kvantifikace půdní mikrobiální biomasy je však z hlediska genotypové a fenotypové diverzity společenstev náročná, avšak velmi důležitá pro porozumění chemicko-fyzikálním dějům v půdě a jejich funkcím v ekosystému celkově [8,76,87].

U mikroorganismů byla zjištěna souvislost s dostupností živin v závislosti na jejich vertikálním výskytu, tedy že množství půdních mikroorganismů je nejvyšší blízko povrchu půdy a klesá s rostoucí hloubkou, přičemž rozhodujícími faktory jsou kromě množství živin také obsah vody, teplota nebo pH. Mikroorganismy představují velmi důležitou součást komplikovaného půdního systému a druhová diverzita i aktivita jejich společenstev je proměnlivá v závislosti na typu půdy [41,168].

### 1.1.1 Složení a struktura půdních mikrobiálních společenstev

Půda je variabilním systémem s nejvyšší genetickou diverzitou organismů na Zemi, neboť půdní mikrobiální společenstva jsou po taxonomické stránce velmi diverzifikovaná a mohou být, u dobře fungujícího půdního komplexu, tvořena až miliony mikroorganismů na jeden gram půdy a skládají se v průměru z  $10^7$  -  $10^{10}$  bakterií (*Bacteria*), aktinobakterií (*Actinobacteria*) a archaeobakterií (*Archaea*),  $10^5$  -  $10^6$  hub (*Fungi*),  $10^4$  -  $10^5$  prvoků (*Protozoa*), řas (*Algae*), sinic (*Cyanobacteria*) a virů [41,172,168,177].

K nejběžněji se vyskytujícím půdním bakteriím náleží řády *Pseudomonas*, *Eubacteria* a *Actinomycetes*, k nimž patří např. *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* nebo *Micrococcus*, významné jsou také bakterie *Thiobacillus* a *Ferrobacillus*, fotosyntetizující sinice (např. *Chroococcus*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena*) a především dusík fixující, tzv. nitrifikační, bakterie rodů *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibria*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira* a hlízkové bakterie, např. *Rhizobium*, *Mesorhizobium* nebo *Sinorhizobium*, žijící v symbióze s bobovitými rostlinami, které v procesu mineralizace dusíku amoniak oxidují na nitrity a nitráty. Fixace dusíku jsou schopny také Gram-pozitivní aktinobakterie rodu *Frankia* žijící v symbióze s kořenovým systémem olší (*Alnus*), viz. Obr. 1. Nitrifikační bakterie jsou využívány jako indikátory environmentálního stresu, změn ekosystému, toxických látek a pro stanovení potenciálu fixace dusíku v půdě [20,25,71].



**Obr. 1:** Hlíзка na kořenech olše obsahující aktinobakterie rodu *Frankia* [19]

Gram-pozitivní aktinobakterie, tvořící kolonie podobné houbovému myceliu, patří mezi bakteriemi k nejrozšířenějším skupinám mikroorganismů v půdě, kde tvoří cca 30 % jejich celkového počtu. Nejvíce bývají zastoupeny rody *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Micromonospora* nebo *Streptrosporangium* a většinou jde o chemoheterotrofní, výjimečně i chemoautotrofní mikroorganismy, které je možné dělit do tří skupin podle tolerance vůči pH, při němž jejich společenstva rostou, na alkalifilní (pH nad 9,0), neutrofilní (pH 5,0 až 9,0) a acidofilní (pH pod 5,0) [12,181].

Houby (*Fungi*), jejichž biomasa v některých půdách v celkovém objemu převládá nad biomasou všech ostatních mikroorganismů, jsou tak rovněž velmi významnou součástí půdních mikrobiálních společenstev, z nichž mnohé vytváří symbiotické vztahy s ostatními mikroorganismy společenstva a také s rostlinami, přičemž největší význam má arbuskulární mykorhiza, zjištěná u více než 80 % rostlinných druhů s houbami řádu *Glomales*, která podporuje obranné mechanismy rostlin vůči půdním patogenům a vlivu nízkého pH. Přítomnost a nepřítomnost těchto hub, které mají vliv na fyziologickou aktivitu rostlin, slouží jako faktor pro hodnocení kvality půdy [40,67,108,146].

### **1.1.2 Mikrobiální aktivita a respirace půdy**

Mikrobiální aktivitu můžeme měřit např. jako rychlost metabolizace určitých substrátů, aktivitu mikrobiálních enzymů nebo respiraci mikrobiálního společenstva. Bývá hodnocena podle rychlosti rozkladu zbytků celulózy, která je pro mikroorganismy nejběžnější a nejsnáze dostupná při měření in situ. Mikrobiální rozklad celulózy je ovlivňován teplotou půdy, která je v místech s méně rozvinutou vegetací a tím nižší vlhkostí půdy limitujícím faktorem [73,84]. Měřítkem mikrobiální aktivity je enzymová aktivita extracelulárních enzymů (např. polysacharidových hydroláz, oxidáz, peroxidáz, fosfatáz nebo sulfatáz) produkovaných mikroorganismy za účelem rozkladu a chemické přeměny organické hmoty v opadu, hlavně celulózy, hemicelulózy a ligninu, ovlivňujícími tak koloběh živin v půdě [11,157]. Aktivita enzymů v půdě ovlivňuje rychlost procesů mikrobiálního společenstva a jeho složení a slouží tak jako ukazatel funkčnosti půdního ekosystému. V průběhu rozkladných procesů se zvyšuje aktivita oxidativních a hydrolytických enzymů, např. aktivita ureázy je měřítkem intenzity transformace dusíku v půdě, indikující dostupnost dusíkatých sloučenin rostlinám. Aktivita enzymů slouží také pro hodnocení obnovy půdních ekosystémů poškozených těžbou, např. aktivita lignocelulolytických enzymů hub a bakterií je v kontaminovaných oblastech snížena [47,88,181] a může být inhibována např. kovy, kdy se celkově sníží mikrobiální biomasa, houby a aktinobakterie vykazují nárůst. Inhibice závisí na půdním typu [12,149].

Aktivita enzymů na lokalitách po těžbě, na nichž již proběhla fáze primární sukcese, je ovlivněna stářím lokality, s nímž se obecně zvyšuje, akumulací organické hmoty, formováním půdních horizontů, měnícím se obsahem živin i sezónními faktory [10]. Významným faktorem ovlivňujícím aktivitu půdních mikrobiálních společenstev během primární sukcese je vliv vegetace, schopné regulovat rychlost akumulace živin a tím celkový vývoj půdy, přičemž determinujícím faktorem je obsah a akumulace půdního organického uhlíku a celkového dusíku. V půdách po těžbě je během primární sukcese enzymová aktivita mikroorganismů dále ovlivněna změnami pH, neboť značné množství enzymů vykazuje ostré pH optimum. Studie, sledující lokality po těžbě ve stáří 4 až 45 let, prokázala korelaci mikrobiální biomasy s obsahem uhlíku, dusíku a fosforu v půdě, kdy maxima enzymové aktivity většiny hydrolytických enzymů a zároveň změn mikrobiálních společenstev dosahovaly 21 let staré plochy, u starších došlo ke stabilizaci nebo zastavení. Rozkladné procesy, zajišťované půdními mikroorganismy, náležícími z většiny k meziaerobním heterotrofům, jsou měřeny jako proces jediný, ačkoli jde o celý komplex procesů, mezi nimiž je významným měřeným faktorem např. půdní respirace [10,159].

Měření mikrobiální respirace je metoda, umožňující sledování mikrobiální aktivity během aerobního rozkladu biologicky dostupné organické hmoty. Protože organická hmota je transformována až na  $\text{CO}_2$  a při tomto procesu se uvolní minerální látky v organické hmotě, hovoříme také o mineralizaci. Měření respirace půdy může být prováděno v laboratorních podmínkách i v terénu, kdy je kromě heterotrofní mikrobiální respirace měřena i autotrofní respirace kořenového systému rostlin. Bazální respirace je stanovována ve vzorku půdy bez přidaného substrátu nebo po přidavku vody, za účelem standardizace měření, a vyjadřuje se jako množství vyprodukovaného oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) na jednotku půdy. Respirace může být též vyjádřena na jednotku mikrobiální biomasy, tzv. metabolickým kvocientem ( $q\text{CO}_2$ ), který, pokud se zvyšuje, indikuje, že na mikrobiální společenstvo působí stresové podmínky, např. kontaminace těžkými kovy, což způsobuje zvýšení potřeby příjmu energie pro udržení schopnosti růstu společenstva a tím také zvýšení produkce  $\text{CO}_2$  na jednotku mikrobiální biomasy v důsledku snížení schopnosti využití uhlíku. Oproti tomu měření tzv. substrátem indukované respirace je kvalitativní analýza, při níž je sledována změna rychlosti respirace po přidavku kapalného substrátu s obsahem lehce dostupného uhlíku, např. glukózy, odrážející max. možnou respiraci společenstva, fyziologický stav mikroorganismů a jejich energetické nároky. Bylo zjištěno, že respirace na jednotku mikrobiální biomasy, tzv. specifická respirace, může se zvyšující se mikrobiální biomasou stagnovat i klesat. Těmito metodami se měří vliv kontaminace půdy na schopnost růstu a funkce mikrobiálního společenstva [7,30,151,159].

### 1.1.3 Význam půdních mikrobiálních společenstev

Mezi mikroorganismy se během evoluce vyvinuly komplexní vazby a interakce na fyzikálně-chemické, biochemické a potravní úrovni (tvoří tzv. půdní potravní síť), ovlivňující další procesy probíhající v půdě včetně interakcí s rostlinami, které mají velký význam pro biochemické cykly prvků [68]. Mikroorganismy tvoří skupiny, které mohou plnit v biochemických cyklech stejnou nebo různou úlohu, mohou se lišit odolností a citlivostí vůči stresu a ekologickou nikou. Schopnosti rychle a citlivě reagovat na změny se využívá při hodnocení půdní mikrobiální diverzity [29]. Půdní mikroorganismy, především bakterie, aktinobakterie a houby, jsou primárními dekompozitory v boreálních lesích a lesích mírného pásma, dominují v rostlinném opadu, ovlivňují půdotvorný proces a jsou řídicím faktorem dostupnosti živin [14]. Význam mikroorganismů v ekosystému uvádí Tab. 1.

**Tab. 1:** Přehled nejdůležitějších významů a funkcí půdních mikroorganismů

<b>Bakterie</b> ( <i>Bacteria</i> )	<b>Houby</b> ( <i>Fungi</i> )	<b>Prvoci</b> ( <i>Protozoa</i> )	<b>Sinice</b> ( <i>Cyanobacteria</i> )	<b>Řasy</b> ( <i>Algae</i> )
koloběh látek a energií v přírodě, biochemické cykly				
dekompozice a syntéza				
zvýšení úrodnosti půdy, podpora růstu rostlin				
tvorba humusu, symbiotické vztahy (mykorhiza), vliv na vodní a vzdušný režim půdy				
rozklad organických reziduí	hniloba dřeva	důležitost pro potravní řetězec	fixace CO <sub>2</sub> , fixace N, produkce O <sub>2</sub>	fixace CO <sub>2</sub> , produkce O <sub>2</sub>
fixace N	soudržnost půdy	stimulace aktivit bakterií	produkce toxinů	primární produkce biomasy
nitrifikace	mykorhiza	saprofyté, parazité, predátoři bakterií, heterotrofní, fagotrofní	produkce slizu - zvětšení agregátů	soudržnost půdy
bioremediace	bioremediace		aerace půdy	biomining
biomining	biopulping			

K základním procesům v uhlíkovém cyklu patří rozklad lignocelulózy na celulózu, hemicelulózu a lignin houbami a aktinobakteriemi, které je dále rozkládají pomocí extracelulárních enzymů na jejich povrchu nebo vylučovaných do okolí, jako jsou např. endocelulázy, celobiohydrolázy,  $\beta$ -glykosidázy, glykosylované hydrolázy, peroxidázy a oxidázy a jsou tak schopny, díky vláknité stavbě, účinně využívat substrát. Enzymy rozloží makromolekulu celulózy na monomer či oligomer složený z jednotek glukózy, která je následně metabolizována, přičemž bakteriemi oproti houbám s vyšší účinností.

Složitější je degradace ligninu, které jsou schopny některé Gram-negativní bakterie a aktinobakterie, ale především houby způsobující bílou hnilobu působením ligninperoxidázy, mangan-dependentní peroxidázy a lakázy. Aktivita enzymů produkovaných mikroorganismy je také indikátorem kvality půdy [12,17,42,78,130,160]. Mikroorganismy řídí rozklad, akumulaci a celkový tok uhlíku v půdních ekosystémech, kdy je autotrofními organismy během fotosyntézy zabudováván CO<sub>2</sub> jako organický uhlík a pak opět uvolňován při dekompozici. Uvolňování fotosyntézou fixovaného uhlíku kořeny rostlin zabezpečuje výživu mykorhizním symbiontům a bakteriím v rhizosféře [22,45,145]. Mikroorganismy provádějící dekompozici je možné rozdělit na tzv. r-stratégy, rozkládající čerstvou organickou hmotu s nízkým C/N poměrem a využívající energeticky bohaté sloučeniny a na tzv. K-stratégy, zpracovávající hůře dostupnou organickou hmotu s vyšším C/N poměrem, limitované však působením rychleji rostoucích r-strategů. Půdní mikroorganismy ovlivňují i cyklus fosforu, síry a dostupnost mikroživin (např. Fe, Zn, Mn či Cu) a stopových prvků změnami redoxního potenciálu a půdního pH [48,128].

## **1.2 Dekompozice a mikrobiální společenstva**

Dekompozice je hlavním biotickým procesem postupného rozkladu organické hmoty opadu, zajišťujícím vstup živin do půdy, závislým na fyzikálních a chemických faktorech prostředí, jako jsou vlhkost, teplota a pH půdy, dále na chemickém složení opadu a půdní organické hmoty a zejména aktivitě mikroorganismů, pro které je půdní organická hmota především zdrojem živin. Dekompozice probíhá ve dvou fázích, přičemž v rané fázi je řídicím faktorem klima, obsah živin a rozpustných látek a proces probíhá rychleji, pozdější fáze rozkladu je pomalejší a závisí na množství ligninu [2,16]. Dekompozice opadu je iniciována vyluhováním nestabilních komponent a uvolněním hlavních živin, uhlíku, dusíku, fosforu, síry a dalších z biomasy, bezprostředně po opadu v závislosti na jeho typu, přičemž míra vyluhování závisí na klimatických podmínkách, především vlhkosti a jsou akumulovány, adsorbovány či využívány půdními mikroorganismy, které pomocí enzymů dále rozkládají a zpracovávají půdní organickou hmotu, která může být také zabudována v půdních agregátech a uhlík se formou humusu a dalších stabilních organických látek ukládá do půdy. Dále dochází k vyluhování rozpustných organických látek, zejména cukrů (hlavně mono- a oligosacharidů), fenolů, jako např. taniny, a také glyceridů, přičemž průměrný obsah v opadu se výrazně mění podle typu dřeviny, kdy např. u olše činí až 30 %, v jehličí borovice však jen cca 7 % [2,190].

### **1.2.1 Vliv teploty, záření, vlhkosti a pH půdy na rychlost dekompozice**

Rychlost a účinnost rozkladu, využití uhlíku mikroorganismy a schopnost vodního prostředí v půdě zajišťovat transport živin během procesu dekompozice se zvyšuje s teplotou, která prostřednictvím fázového rozpínání a smršťování vody mechanicky rozrušuje opad na menší části [34,88]. Dekompozici ovlivňuje přímým i nepřímým způsobem fotodegradace organických a anorganických částí půdy UV-B zářením, která tak působí na půdní procesy, dekompozitory, spotřebitele i primární producenty, přičemž nemusí být záření přímo vystaveni. Nejsilnější je vliv záření na opad v prvních měsících, kdy je fotochemicky rozkládán lignin, dochází ke ztrátě hemicelulózy, která se s hloubkou snižuje, stejně jako imobilizace dusíku. Fotodegradace takto pravděpodobně nepřímým způsobem zvyšuje rychlost mikrobiálního rozkladu [14,110,122].

Významný vliv na mikrobiální společenstva při dekompozici má vlhkost půdního prostředí, neboť při nižším obsahu vody dochází ke snížení schopnosti látek difundovat, mikroorganismy tak dostávají méně živin a jejich aktivita klesá. Vzhledem k tomu, že na půdní vlhkost má vliv mnoho dalších faktorů, tak vyšší vlhkost nezaručuje vždy kvalitnější dekompozici, jako je tomu např. v energeticky omezených boreálních lesích. Výkyvy v obsahu vody tak mohou pravidelně stimulovat mikrobiální činnost a měnit skladbu mikrobiálních společenstev, přičemž vyšší toleranci vůči suchu mají houby. Nadměrná půdní vlhkost pak snižuje dostupnost kyslíku potřebného pro proces dekompozice [34,74,112].

Během dekompozice se také výrazně projevuje přímý vliv půdního pH na množství mikrobiální biomasy i složení mikrobiálních společenstev, kdy např. dochází k nárůstu acidofilních organismů na úkor ostatních druhů, při poklesu pH vyvolaném kyselým opadem, kořenovými exudáty nebo CO<sub>2</sub> uvolněným rozkladem. Nepřímý vliv pH na mikrobiální společenstva pak spočívá v ovlivnění rozpustnosti, mobility a tím i dostupnosti nejen živin, ale např. také toxických prvků. Vyluhování opadu při nízkém pH probíhá velmi pomalu a mimo ve vodě rozpustných látek jsou vyplavovány např. také vyšší mastné kyseliny nebo fenoly, oproti tomu při vyšším pH se zvyšuje rychlost a účinnost fixace dusíku [16].

### 1.2.2 Složení opadu a poměr C/N

Kvantita a chemická kvalita opadu má za příznivých vnějších podmínek největší vliv během počáteční fáze dekompozičního procesu na množství a strukturu mikrobiálního společenstva a jeho schopnost zpracovávat organický materiál. Rychlost dekompozičního procesu je závislá na stechiometrickém poměru uhlíku a dusíku (C/N) a na obsahu ligninu, kterého je více v oblastech s vyšší teplotou a vlhkostí, přičemž se zvyšujícím se poměrem C/N klesá a stejně tak v případě poměru ligninu a dusíku, jehož obsah v půdě závisí na vegetačním pokryvu [36,95,190]. Půdy s poměrem C/N v rozmezí 15 až 18 jsou označovány za dusíkem dostatečně zásobené, půdy s poměrem C/N cca 10 bývají černozemě a rendziny s vysokou mikrobiální aktivitou, kdy při rozkladu organické hmoty dochází k mineralizaci dusíku. Kyselé anaerobní ekosystémy rašelinišť se vyznačují vysokým poměrem C/N 50 až 60, kdy při rozkladu organické hmoty dochází k imobilizaci dusíku. Stanoviště bohatá na živiny se vyznačují rychlejším průběhem dekompozice, zatímco stanoviště chudá produkují v rostlinné biomase obtížněji rozložitelný opad s vysokým poměrem C/N [3,112].

Dle některých studií je rychlost dekompozice obsahu dusíku přímo úměrná, avšak byl dokázán i neutrální a dokonce negativní vliv jeho nadbytku [72,100]. Podle teorie tzv. stechiometrického rozkladu dochází k maximální mikrobiální aktivitě a míře rozkladu v případě stechiometrického vstupu uhlíku a dusíku vzhledem k nárokům mikrobiální biomasy. Oproti tomu teorie tzv. těžby mikrobiálního dusíku předpokládá využívání snadno dostupného uhlíku, jako zdroje energie, mikroorganismy k rozkladu organických látek nezávisle na obsahu dusíku v nich [75,81]. Obsah dusíku v listovém opadu běžně dosahuje hodnoty cca 0,3 % a dřevnaté části rostlin pak obsahují jen cca 0,02 %, celkový obsah dusíku v půdě pak souvisí s obsahem humusu [16,164]. C/N poměr ovlivňuje dynamiku organické hmoty a tím dostupnost živin pro rostliny. Mikrobiální biomasa i respirace je u opadu z jehličnanů vyšší, než u opadu z listnatých dřevin s vysokým poměrem C/N (např. dub) a opad stromů s nízkým poměrem C/N (např. olše), vykazuje respiraci nižší. Sukcesí jsou druhy s vysokým obsahem dusíku a nízkým C/N poměrem v listech nahrazovány druhy s opačnými vlastnostmi [5,35,109].

Některé mikroorganismy fixují molekulární dusík přímo z atmosféry a redukují jej na amoniakální dusík ostatními organismy asimilovatelný do biomasy, z níž je pak formou amonných iontů nebo dusičnanů vstřebáván rostlinami, zejména symbiotickými s fixátory dusíku. Odumřením biomasy dojde k uvolnění dusíku, který tak může být znovu využit, vázán v půdě, volatilizován, nitrifikován na nitrátovou formu nebo naopak denitrifikován na oxid dusný ( $N_2O$ ) a molekulární dusík [116,152].



Uhlík, jehož dostupnost se mění v závislosti na složení opadu, se do půdy dostává převážně formou celulózy a ligninu z opadu a také z cca 15 % až 25 % z kořenových exudátů rostlin, které jsou pro mikroorganismy nejdostupnějším zdrojem uhlíku díky jednoduchým řetězcům těchto látek [16,22,144].

### **1.2.3 Působení ostatních půdních organizmů**

Proces mineralizace organických látek je výrazně ovlivněn zejména půdní mikroflórou, jejíž populační dynamiku a tím také účinnost dekompozice moduluje predace půdní mikrofaunou, která většinu organické hmoty pouze přeměňuje. Organická hmota je rozkládána bakteriofágními hlísticemi (*Nematoda*) a prvoky (*Protozoa*) konzumujícími při nedostatku bakterií i jiné menší prvoky, celulózu, houby nebo huminové sloučeniny [22,63,90,105,144].

Dekompozice je významným způsobem ovlivňována také půdní mezofaunou a makrofaunou, jejichž funkce spočívá v konzumaci opadu, změnách chemického složení půdy a pH, promíchávání a provzdušňování půdy a také predaci. Z hlediska druhové diverzity půdního edafonu jsou nejvýznamnější členovci (*Arthropoda*), jako jsou chvostoskoci (*Collembola*), stonožkovci (*Myriapoda*), stejnonožci (*Isopoda*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*) včetně jejich larev, představující až 85 % veškeré půdní fauny, kteří mají ve spolupůsobení s mikrobiální a rostlinnou biomasou významný vliv na organickou hmotu a transport živin. Nejvýznamnější je vliv kroužkovců (*Annelida*), zejména žížal, náležících do třídy máloštětinatců (*Oligochaeta*), vytvářejících svým pohybem v půdě stabilní vertikální, v případě anektických druhů, nebo horizontální chodbičky u druhů endogeických, díky nimž dochází k promíchávání a tím také provzdušňování půdy, přičemž chodbičkami zároveň může snadněji pronikat voda [22,79,96,144,177]. Činnost žížal pomáhá chemicky rozkládat, rozmělnovat a zvlhčovat opad, čímž zvyšují dostupnost živin pro mikrobiální společenstva a podporují tak jejich růst a distribuci, zabudovávají dusík do půdních struktur a bylo prokázáno, že obsah uhlíku v půdní organické hmotě vykazuje na hustotě žížal dokonce přímou závislost. Vzhledem k přítomnosti mikroorganismů ve střevě žížal, obsahují pak jejich exkrementy oproti substrátu, před tím, než projde jejich trávením, celkově vyšší množství mikroorganismů, navíc jejich trávicí systém disponuje žlázami produkujícími zásadité látky neutralizující huminové kyseliny v substrátu, které vylučované v exkrementech pomáhají neutralizovat kyselost půdy, přičemž tyto exkrementy obsahují značně rozrušený opad jednodušeji zpracovatelný mikrobiální biomasou pro mineralizaci živin [22,28,62,137,144].

### 1.3 Hodnocení půdních mikrobiálních společenstev

Z vědeckého a např. zemědělského hlediska je porozumění vlastnostem mikrobiální biomasy, její aktivity a diverzity, které ovlivňují stav půdních ekosystémů, velmi důležité a analýzy mikrobiálních společenstev mohou být využity pro praktická opatření ke zlepšování kvality půdy. Z důvodu dobře definovatelných vztahů mikrobiální diverzity, půdy a rostlin v kontextu celého ekosystému v současnosti slouží vlastnosti půdních mikrobiálních společenstev jako relativně vysoce citlivé indikátory vitality půdního systému [76].

Vlastnosti půdních mikrobiálních společenstev byly standardně studovány na úrovni procesů probíhajících v biomase, např. hodnocením rychlosti respirace nebo enzymatické aktivity, jejichž měření poskytují informace o úloze základních mikrobiálních procesů, avšak jejich výpovědní hodnota kvalitativních změn na úrovni společenstva je z důvodu diverzity taxonů, které mohou provádět daný proces v půdě, nízká a nepopisují mikrobiální ekosystémy. Interakce na úrovni mikrobiálního společenstva jsou velmi složité a závisí na mnoha faktorech, např. na přítomnosti daných druhů, jejich funkci a vzájemných interakcích s dalšími druhy, což je však zároveň důvodem, proč mohou být tyto kvalitativní a kvantitativní změny ve složení společenstev využívány jako citlivé ukazatele změn v půdních ekosystémech z krátkodobého i dlouhodobého hlediska, avšak pro komplexní analýzu půdního mikrobiálního společenstva je třeba zahrnout také stanovení růstu mikroorganismů, distribuci a funkce a pokud možno i mezidruhovú interakce [76].

Půdní mikrobiologie dlouhodobě řešila vývoj účinných metod, schopných určit přítomnost mikroorganismů v půdě a stanovení jejich funkce in situ. V současnosti jsou dostupné metody, umožňující kvalitní detekci půdních mikroorganismů, jejich diverzity, distribuce a chování na přirozených stanovištích, jejichž vývoj neustále pokračuje. Pro porozumění funkcím aktivity mikroorganismů v ekosystémech je základním předpokladem reprezentativní odhad diverzity mikrobiálních společenstev [76,87].

Analýza půdních mikrobiálních společenstev byla klasicky prováděna pomocí kultivačních technik za použití různých kultivačních médií, avšak tento způsob umožňoval obsáhnout jen malou část (<0,1 %) půdního mikrobiálního společenstva. Ke kvantifikaci půdní mikrobiální biomasy existuje řada dalších metod využívajících např. mikrobiální respiraci, enzymatickou aktivitu či obsah ATP jako indikátory, které však umožňují hodnocení pouze obecné charakteristiky půdní mikrobiální biomasy [76,187].

Molekulární metody, využívající např. amplifikaci malých podjednotek rRNA genů (SSU rRNA) z nukleových kyselin, přinesly do výzkumu mikrobiálních společenstev nové možnosti analýzy fylogenetické diverzity s možností charakterizovat půdní mikroorganismy v současnosti uměle nekultivovatelné a provádět tak komplexní kvantifikaci půdní mikrobiální biomasy. Studium půdních mikrobiálních společenstev musí pro celistvější informace o podílu jednotlivých mikrobiálních společenstev na kvalitě a vitalitě půdy využívat kombinace kultivačních a kultivačně-nezávislých metod [76,127].

### **1.3.1 Analýza společenstva - kultivační metody**

Kultivace mikroorganismů za účelem jejich identifikace zjišťováním přítomnosti vybraných enzymů, metabolických drah nebo mikrobiálních společenstev, pomocí metabolizace zdroje uhlíku (např. sacharidy, proteiny), která vyvolá barevnou změnu indikátoru, patří v rámci studia biodiverzity mezi základní biochemické postupy [102]. Komplexní informace o struktuře a složení půdních mikrobiálních společenstev lze získat jen kombinací metod kultivačních s kultivačně nezávislými (viz. oddíl 1.3.2 Analýza společenstva – kultivačně nezávislé metody), neboť při samostatném využití, jakkoli je obecně možné kultivačními metodami zjišťovat diverzitu půdních mikroorganismů a jejich kvalitativní parametry (např. rozklad organické hmoty), nejsou dostatečné především pro porozumění růstu, vývoji a funkcím mikroorganismů v půdních procesech [76].

Mezi nejběžnější metody kultivace, založené na klasických metodách bakteriální taxonomie, užívané pro analýzu půdních mikrobiálních společenstev, patří tzv. fyziologické profily na úrovni společenstva, např. komerční systém BIOLOG, identifikující přes 2500 druhů aerobních bakterií, anaerobních bakterií, kvasinek i hub podle jejich způsobu využití 95 dříve popsanych zdrojů uhlíku, dusíku, síry a fosforu umístěných v jamkách na mikrotitračních destičkách, do nichž jsou inokulovány předem nakultivované bakterie, přičemž jsou zároveň testovány také vlivy pH a osmotické podmínky. Samotná identifikace probíhá spektrofotometricky kvantifikací změny barvy způsobené redukcí tetrazolinového barviva výměnou elektronů při respiraci. Pro určení hrubé funkční diverzity mikrobiálního společenstva je fyziologický profil na úrovni společenstva, navzdory možnému zkreslení výsledků a tím interpretaci dat, důležitý [76,102].

Výhodou tohoto systému je možnost zisku relativně obsáhlého množství dat o fyziologických schopnostech analyzovaných mikrobiálních společenstev, umožňujících jejich odlišení a zároveň sledování vývoje jednoho společenstva, technicky nenáročným způsobem, který má však určitá omezení, např. citlivost k hustotě inokula, charakterizuje jen část společenstva schopnou růstu v daných podmínkách s upřednostněním rychle rostoucích mikroorganismů a spíše než o reálné, informuje o potenciální metabolické aktivitě [102].

Na počátku 90. let 20. století byl zájem o využití tohoto systému pro celkovou analýzu složení a metabolického potenciálu mikrobiálních společenstev inokulací destičky mikrobiální frakcí z environmentálního vzorku místo kultury jediného izolovaného mikroorganismu. V současnosti jsou pro analýzu mikrobiálních společenstev využívány destičky pro houby, kvasinky, G+ a G- bakterie nebo tzv. systém EcoPlate, jehož výstupem je tzv. „fingerprint-profil“, neboli fyziologický (metabolický) profil daného mikrobiálního společenstva [102].

### **1.3.2 Analýza společenstva – kultivačně nezávislé metody**

Vzhledem k výše uvedeným omezením kultivačních metod jsou častěji využívány metody kultivačně nezávislé, umožňující hodnocení složení společenstev po provedení extrakce, kvantifikace a identifikace molekul, specifických pro dané mikroorganismy nebo mikrobiální společenstva, z půdy či pokročilou fluorescenční mikroskopickou technikou. Pro tyto studie jsou důležité fosfolipidové mastné kyseliny (viz. oddíl 3.3.5 Limitace analýzy PLFA) a nukleové kyseliny [76].

Kultivačně nezávislou metodou je např. analýza specifického biomarkeru využitelná pro studium diverzity i charakteristiku struktury mikrobiálních společenstev, např. analýza lipidového profilu, neboť lipidy, jako základní stavební kameny struktury buněk, plní funkce zásobních látek, specifických mediátorů a aktivátorů signálních procesů, přičemž se složením v jednotlivých organizmech liší a na základě rozdílů pak mohou být odlišovány jednotlivé druhy mikroorganismů. K nejpoužívanějším biomarkerům patří tzv. FAME a PLFA [102].

Principem analýzy methylesterů mastných kyselin (FAME) je esterifikace lipidů s nástřikem, separací a identifikací methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií (GC). Jedná se o relativně rychlou a finančně nenáročnou metodu, avšak interpretace dat je složitější, neboť značný počet mastných kyselin je pro organismy společný. Tento způsob analýzy je použitelný i pro stanovení lipidů (včetně zásobních) mrtvé organické hmoty, citlivých na podmínky růstu, což umožňuje identifikaci živé i mrtvé mikrobiální biomasy a charakterizaci diverzity společenstev [102].

Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA), viz. oddíl 3.3.4 Analýza půdních mikrobiálních společenstev pomocí PLFA a 3.3.5 Limitace analýzy PLFA, přistupuje k hodnocení struktury půdního mikrobiálního společenstva kvantitativně, hodnotí jeho změny a současně minimalizuje artefakty a metodická zkreslení. [150,184].

Studie genetické rozmanitosti půdy na základě analýzy nukleových kyselin hodnotí bakteriální diverzitu jako 200x větší oproti kultivačním metodám, z čehož vyplývá, že půdní mikrobiální společenstva jsou daleko více strukturně složitější a analýza sekvencí DNA je schopna podat o půdních mikroorganismech ucelenější informace, než jaké lze získat kultivačními metodami. Jak bylo potvrzeno studiemi, z více než 90 % mikroorganismů, pozorovatelných mikroskopicky in situ, lze rDNA extrahovat a analyzovat [76]. Metody studia rDNA existují v mnoha modifikacích, využití její genetické informace je vždy podmíněno izolací nukleové kyseliny z biologického materiálu zakoncentrováním a teprve poté může následovat zpracování pro další aplikace.

Mikrobiální rDNA lze izolovat buď přímo (in situ) v půdní matrici, kdy jsou mikroorganismy lyzovány a uvolněná rDNA je extrahována a čištěna a nebo nepřímo (ex situ), kdy se nejdříve mikroorganismy extrahují z půdní matrice a teprve následně jsou mikrobiální frakce lyzovány [102]. Nukleové kyseliny pak mohou být analyzovány a identifikovány pomocí biomarkerů, a to i na druhové úrovni, citlivými metodami s vysokou genetickou specifikou, buď klasickou cestou např. polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) nebo modernější metodou, jako je např. next gene sequencing. V současnosti se analýzy zaměřují na charakterizaci půdních mikrobiálních společenstev na základě rRNA na rozdíl od genů pro rRNA kódovaných rDNA [76]. I tato metoda však má určitá omezení, např. nekonzistenci regenerace DNA, DNA z mrtvých buněk, pracný odběr reprezentativních vzorků v polních podmínkách a potřeba zvláštních primerů a sond na základě znalosti předchozích sekvencí [87]. Půda je velmi složitá a heterogenní matrice a v současnosti není známa metoda založená na extrakci DNA, u níž by nedocházelo ke zkreslení výsledků, navíc byl tento přístup aplikován převážně ve výzkumu prokaryot. Zásadní výhodou analýzy SSU rDNA je možnost charakterizace studovaných mikroorganismů odebraných z přírodního stanoviště bez předchozího použití běžných kultivačních technik, které nejsou pro studium půdních mikrobiálních společenstev vždy přístupné, napak ve spojení s fluorescenčními oligonukleotidovými sondami umožňuje použití SSU rRNA či sekvencí rDNA výkonný přístup [76].

K základním metodám určování diverzity mikrobiálních společenstev patří fylogenetické analýzy, na základě předchozího klonování PCR produktů a sekvenování získaných klonů, s využitím univerzálních primerů genu 16/18S rRNA. rDNA a rRNA jsou v těchto analýzách jako znaky používány standardně, ostatní znaky mohou poskytovat u mikroorganismů nejvíce informací o morfologických i molekulárních údajích. Fylogenetická analýza je, mimo odvození taxonomie, významná také pro pochopení fyziologie i ekologie doposud nekultivovatelných druhů mikroorganismů možností určování vzájemných podobností mezi různými mikroorganismy. Nevýhodou této metody je však založení analýzy na jednom typu molekul a omezeného souboru taxonomických kritérií, což neposkytuje jistotu určení neznámého mikroorganismu [76,102].

Další kultivačně nezávislou metodou je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), umožňující přímé identifikování a kvantifikaci obecných i specifických taxonů půdních mikroorganismů, hlavně prokaryot, v přirozeném mikrostaništi. Tato metoda používá vizualizaci 16S nebo 23S rRNA celých buněk fluorescenčně označených a hybridizovaných taxonomicky specifickou oligonukleotidovou sondou, konfokální laserovou rastrovací mikroskopií (CLSM). Hybridizace celých buněk eliminuje artefakty vznikající chybami během extrakce DNA, amplifikace PCR a klonování. Metoda FISH se uplatňuje při studiu funkce mikroorganismů v rámci struktury mikrobiálního společenstva, ekologické distribuce půdních mikroorganismů na stanovištích a je navíc kombinovatelná s kultivačními metodami, imunofluorescencí apod. Metoda FISH slouží ke studiu populační dynamiky, monitoringu mikroorganismů v rámci biologické ochrany, bioremediaci, epidemiologii a mikrobiální ekologii patogenů hospodářských rostlin [76].

### **1.3.3 Metody založené na posouzení velikosti SMB**

K posouzení vlivů na půdní mikrobiální biomasu ve vzorcích půd lze použít některou z metod stanovení velikosti celkové SMB v půdě, jako např. chloroformovou fumigační extrakci (CFE), což je standardně využívaná metoda, zejména pro rychlé uvolnění a snadný postup extrakce uhlíku uvolněného z půdní mikrobiální biomasy, při níž se buňky v půdním vzorku alespoň 24 hodin lyzují parami chloroformu a dochází k uvolňování uhlíku z mikrobiální organické hmoty do půdy. Obsah organického uhlíku se stanoví z extraktů s 0,5 M dichromanem draselným ( $K_2SO_4$ ) se silnou kyselinou s následující titrací Mohrovou solí nebo i pomocí spektrofotometrických metod.

Mrtvou organickou hmotu však fumigace výrazně neovlivní, a proto může být obsah mikrobiálního uhlíku stanovován jako rozdíl fumigovaných a nefumigovaných vzorků, z něhož je vypočten obsah půdního mikrobiálního uhlíku (SMBC) podle rovnice:

$$\text{SMBC} = (\text{CF} - \text{CNF})/\text{Kec} [\mu\text{g/g suché půdy}]$$

kde CF je oxidovatelný uhlík extrahovaný z fumigovaných vzorků po odečtení blanku, CNF znamená oxidovatelný uhlík extrahovaný z nefumigovaných vzorků po odečtení blanku a Kec je tzv. kompenzační faktor, definovaný pro různé typy půd v rozmezí hodnot  $< 0,2$  pro vzorky z hloubky  $> 40$  cm do hodnoty  $0,45$  pro zemědělské půdy.

Hodnota mikrobiální biomasy se vyjadřuje jako hmotnost uhlíku vztažená na jednotku hmotnosti půdy. Tímto způsobem lze tedy stanovit mikrobiální biomasu v půdě přímo bez separace mikroorganismů a také množství uhlíku v biomase i mimo buňky z nefumigované půdy. Za nedostatek této metody lze považovat, že zjištěné údaje neposkytují informace o stavu společenstva z fyziologického hlediska, jsou pouze kvantitativní a pro kvalitativní stanovení mikrobiálního společenstva je třeba doplnit analýzu o další metody [8,98,186].

Druhou metodou je tzv. substrátem indukovaná respirace (SIR) založená na aktivitě SMB, kdy je měřena jeho odezva na čerstvě přidaný substrát, kterým je z důvodu nejlepší biologické dostupnosti glukóza. Korelaci  $\text{CO}_2$  (v  $\mu\text{l}$  na  $\text{g}^{-1}$  půdy) vznikajícího po předem stanovenou inkubační dobu se SMBC (v  $\mu\text{g}$  na  $\text{g}^{-1}$  půdy) znázorňuje následující rovnice: [7]

$$\text{SMBC} = (40,04 \times \text{CO}_2) + 0,37 [8]$$

Srovnáním obou výše popsaných metod na vzorcích čtyř půd bylo v případě měření metodou SIR po přidavku vápna, na rozdíl od měření metodou CFE, zjištěno zvýšení SMB, což bylo způsobeno jeho odezvou na přidavek nového substrátu, neboť SIR měří aktivitu SMB oproti CFE metodě zaznamenávající celkovou SMB, která je citlivá na chloroform. Z tohoto důvodu je měření SMB metodou CFE považováno za robustní a stabilní [136].

Ze srovnání s předchozími metodami CFE a SIR s metodou tzv. celkových extrahovatelných fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) vyplynula téměř shodná citlivost, jako v případě půdní respirace, avšak jen slabá korelace. Metoda PLFA je výhodná z hlediska snadné analyzovatelnosti extraktů pro identifikaci odlišností extrahovatelných PLFA, čímž lze získat informace o velikosti a složení SMB a je tedy možné PLFA označit za index SMB [8].

## 2 SUKCESE, REKULTIVACE A TVORBA PŮDY NA VÝSYPKÁCH

### 2.1 Sukcese a rekultivace na výsypkách

Výsypky vznikají nasypáváním odtěženého nadloží zakladači během povrchové těžby, např. hnědého uhlí, do umělých útvarů vertikálně členité morfologie, podmiňující heterogenitu stanovišť. Mohou být ponechány sukcesi nebo rekultivovány, což přináší odlišné podmínky odrážející se v druhové skladbě osidlujících organismů, kdy se na vytvořených refugiích sukcesních ploch vyskytují druhy ohrožené a vzácné, které jsou vázány k ubývajícím stanovištím a plochy rekultivované bývají obývány druhy obecnými. Z biologického hlediska tedy mají sukcesní plochy velký význam prokázaný mnoha tuzemskými a zahraničními studiemi, přesto je většina výsypek v ČR komplexně technicky rekultivována urovnáním původního členitého terénu, odvodněna a dále obhospodařována zemědělským nebo lesnickým způsobem (viz. následující oddíl 2.1.1 Lesnická rekultivace), čímž bývá zničeno mnoho biologicky hodnotných ploch blížících se zvláště chráněným územím [26,134,165,175,179].

Členitý povrch výsypek, chemicko-fyzikální vlastnosti zemin, vodní režim a obsah živin zásadním způsobem ovlivňují podmínky pro možné uchycení a šíření vegetace, snáze probíhajícího na plochách sousedících s již rozvinutou vegetací bohatou na semena. Na výsypkách dochází, s výjimkou několika druhů dřevin, např. bezu černého (*Sambucus nigra*), vrby jívy (*Salix caprea*) nebo topolu osika (*Populus tremula*), schopných uchycení se na nových výsypkách, vždy nejdříve k obsazení stanovišť ruderními druhy [26,27,176,179], které začnou být po cca 25 letech v závislosti na změnách půdních poměrů vyvolaných činností žíhal a půdních bezobratlých, kdy vznikají hlubší a strukturně diverzifikovanější organické horizonty, postupně nahrazovány lučními a lesními druhy, v pozdější fázi sukcese pak nastupují domácí dřeviny a neruderální bylinné a travinné druhy [15,60,133,139].

Nerekultivované výsypky ponechané sukcesi se tak postupem času spontánně mění z travních porostů na lesostepi náletových dřevin [134,165,175]. Sukcesní vývoj poškozeného stanoviště je dlouhodobým procesem, který se však v případě dobrých ekologických podmínek může blížit rychlostí rekultivovaným plochám a s jejich stářím se rozdíl postupně ještě více snižuje. Ve vývoji půd na plochách do 20 let věku byly zjištěny významné rozdíly, zatímco mezi plochami 40 a víceletými jen málo znatelné.



Rekultivace, narozdíl od sukcese, která začíná probíhat velmi brzy po nasypání výsypky, jsou prováděny teprve po 2 až 10 letech a začínají terénními úpravami, při nichž jsou likvidována primární sukcesní společenstva, což má negativní vliv na diverzitu a znesnadňuje určení stáří ploch. Již během těžby by proto sukcese měla být brána v úvahu a měly by být tvořeny výsypky s členitějším terénem a v jejich blízkosti ponechávána přírodní společenství blížící se přirozeným [60,123,133,139,156].

Základem úspěšné rekultivace území, která pomáhá urychlit vývoj půdy a snižovat erozi, závisující na mnoha faktorech, je tedy nalezení vhodného rekultivačního mixu a poměru rekultivované plochy k plochám ponechaným spontánní sukcesi s ohledem na potenciál využití krajiny [52,134,165,169,175].

### **2.1.1 Lesnická rekultivace**

Lesnická rekultivace plní mnoho funkcí, zejména asanační, půdoochrannou a hydrickou, ale také ekonomickou a jejím cílem je vytvoření nového lesního porostu s různým funkčním zaměřením. Lesnickou rekultivací mohou vznikat buď lesy produkční (těžba dřeva), složené z tradičních porostů rychle rostoucích lignikultur nebo lesy účelové, tedy rekreačního, agromelioračního, hydrického a stabilizačního významu a mohou tvořit doprovodnou nebo jen dočasnou zeleň, rozptýlenou zeleň okolo cest a vodních děl apod. Rekultivační vegetace však plní především půdoochrannou a pedogenetickou funkci. Tento způsob rekultivací je nejméně náročný na územní a technickou vybavenost a je prováděn zejména na svažitých částech terénu. Rekultivační práce probíhají v pětiletém biologickém cyklu, počínajícím výsadbou dřevin do předem chemicky a mechanicky předupravené půdy, po níž následují ožínání, okopávání sazenic, zavlažování a ochrana proti okusu zvěří, během jedenáctého roku od počátku rekultivace se provádí prořezávání porostů [58,140,161,169]. Převrstvení ornici se v případě lesnických rekultivací většinou neprovádí, ačkoliv je prospěšné z hlediska obsahu kořenů a semen vytrvalých rostlin a křovin [52,53,121].

Zatravňování, prováděné v rámci protierozních opatření, negativně ovlivňuje chemické vlastnosti půdy, způsobuje její zhutňování a kompetici především o vodu a živiny se stromy, které mají zásadní vliv na mikroklima stanoviště a cyklus živin (např. sekvestrace uhlíku) v rhizosféře [31,33,180]. Z hlediska ekologie je důležité dbát na autochtonnost vysazovaných druhů dřevin, tedy upřednostňovány by měly být dřeviny domácího genofondu a rychle rostoucí druhy tolerující náročné podmínky, vytvářející kvalitní kořenový systém [38,162].

### 2.1.2 Rekultivační dřeviny

Dřeviny pro lesní rekultivace lze rozdělovat podle různých kritérií, např. podle pedomelioračních schopností, závislých na kvalitě opadu, které jsou velmi významné pro látkový koloběh. Mezi dřeviny s velkou pedomeliorační účinností patří trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*), což je však invazní neofyt, dále olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*), topoly (*Populus*), jilmy (*Ulmus*), líska (*Corylus*) a habr obecný (*Carpinus betulus*). Dřeviny jako lípy (*Tilia*), vrba (*Salix*), dub zimní, letní (*Quercus robur*; *Q. petraea*), javor klen (*Acer pseudoplatanus*), javor mléč (*Acer platanoides*), bříza bělokorá (*Betula pendula*) a jeřáby (*Sorbus*), buk lesní (*Fagus silvatica*), topol osika (*Populus tremula* Linné) se vyznačují střední účinností a např. u jedle bělokoré (*Abies alba*), smrku ztepilého (*Picea abies*), borovice lesní (*Pinus sylvestris*), modřínu opadavého (*Larix decidua*), je tato schopnost nízká, přičemž většina těchto druhů náleží k nejčastěji používaným cílovým dřevinám. Hojně bývají k výsadbě využívány ale i další druhy dřevin, jako např. borovice blatka (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*), borovice kleč (*Pinus mugo*) a také nepůvodní druhy, jako borovice černá (*Pinus nigra*) a borovice vejmutovka (*Pinus strobus*), smrk pichlavý (*Picea pungens*), javor jasanolistý (*Acer negundo*), pajasan žláznatý (*Ailanthus altissima*), dub červený (*Quercus rubra*) aj. [58,140,161,169].

Velmi často dochází k vysazování monokultur právě některých výše jmenovaných, a to olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) dubu letního (*Quercus robur*), dubu zimního (*Quercus petraea*) i dubu červeného (*Quercus rubra*), javoru klen (*Acer pseudoplatanus*) či smrku ztepilého (*Picea abies*) a především borovice lesní (*Pinus sylvestris*), viz. Obr. 2, čímž sice dojde k relativně rychlé obnově, nevznikne však přirozený les [58,69].



**Obr. 2:** Lesnická rekultivace - borová monokultura [135]

Během pionýrské fáze, kdy je snižena biodiverzita a ekosystémem není vyvinutý, se může vývoj lesa i zastavit [115,180]. Borové monokultury bývají pro zpevňující efekt vysazovány při rekultivacích pískoven do hustých řad, kde se vytvoří jen minimální podrost, neboť rychle odčerpávají živiny a po cca 20 letech se zastaví i přírůst borovic, proto někdy bývá před výsadbou navezena zemina [153].

### **2.1.3 Vliv rekultivačních dřevin na vývoj a vlastnosti půd**

Olše lepkavá (*Alnus glutinosa*) je typická rekultivační přípravná dřevina, původní druh lužních lesů a bažin, uplatňující se při zpevňování břehů vodních toků nebo hrází rybníků. Olše velmi dobře tvoří pařezové výmladky a bez problémů prosperuje i na chudších hlinitých až jílovitých nebo i degradovaných, vlhkých a pravidelně zaplavovaných půdách, a to díky rozvinuté kořenové mykorhize, umožňující vázání vzdušného dusíku [118], pro kterou je vysazována při lesnické rekultivaci výsypek, kde se v porovnání s např. borovicí (*Pinus*) nebo břízou (*Betula*) v prvním roce nejlépe adaptuje a nejvíce akumuluje nejen dusík, ale také uhlík v organickém O-horizontu, má ale také vliv na snížení pH půdy. Stejně tak v porovnání se smrkem (*Picea*) byla u olší zjištěna vyšší akumulace uhlíku v nadzemní biomase a pozitivní korelace s jeho ukládáním v půdě, přičemž obsah uhlíku byl pozitivně ovlivňován žízlami. Kořenový systém olše se soustřeďuje mezi nadložním humusem a svrchní, na živiny bohatou, minerální vrstvou, kde probíhají nejvýznamnější biologické procesy [35,82,85,86,104]. Jsou-li vysazovány smrkové monokultury, které nemají na hlubší půdní horizonty žádný vliv, dochází vlivem různých druhů kořenových mikroorganismů, produkujících organické kyseliny, k poklesu pH půdy [31,82,107,111].

Dalšími dřevinami, hojně využívanými pro lesnické rekultivace jsou dub letní (*Quercus robur*) a bříza bělokorá (*Betula pendula*). Dub letní je vhodný pro těžší a humózní, mírně vlhké, mokré i zaplavované, výživné čerstvé půdy, avšak je schopen tolerovat i půdy s nižším obsahem živin, stejně jako sušší utužené půdy, projevuje však citlivost vůči klesání hladiny spodních vod. Během posledních desetiletí dochází k obnově přirozené porostní skladby výsadbou dubu, jak kosterní dřeviny, v rozvolněných skupinách [82,118]. Bříza je velmi rozšířeným rekultivačním pionýrským druhem vhodným pro vlhčí písčito-hlinité půdy, kde může být vysazována bez předchozích úprav, např. navážka ornice. Velmi dobře snáší také velmi kyselé půdy a vytvářejí symbiózu s houbami, včetně stopkovýtrusných. Při výsadbě je však potřeba použití vhodného podrostu, neboť břízy odčerpávají ze svého okolí značné množství živin a vody. Zajímavou vlastností je vysoká odolnost mrazu až do -35 °C [118].

## 2.2 Tvorba půd na výsypkách a jejich vlastnosti

Proces tvorby půdy spontánním způsobem nebyl narozdíl od rekultivovaných výsypek dlouhodobě studován, avšak je zřejmé, že je podmíněn mnoha faktory, např. proměnlivou kvalitou substrátů, postrádajících recentní organickou hmotu [4,57,65,92], z nichž se výsypka skládá, která je dána vlivem různé zrnitosti substrátů (písčítost či kamenitost) s obsahem jílových a jílům podobných minerálů z nadloží, zvětřitelností (zvětřívání substrátu je základním parametrem), skeletovostí, infiltračními vlastnostmi, dostupností živin, celkovým chemismem substrátů (salinita, těžké kovy), podmiňujícím minerální sílu i diagenézí. Nejnížší minerální sílu mají substráty s vysokým obsahem křemene, střední minerální sílu nacházíme u substrátů vzniklých odvápněnými sprašemi a hlínami a také na jílech s vyšším podílem kaolinitu a naopak nízkým podílem trojvrstevných jílových minerálů, nejvyšší minerální sílu pak jeví substráty terciérních tufických jílů s bentonity a jílů s vysokým obsahem montmorillonitu a vápníku, rovněž tak substráty vzniklé z holocenních hlín a spraší. Jedním ze základních faktorů vzniku půd je biologické zvětřívání a dle poměru jemnozrnné složky substrátu se tvoří lehké, středně těžké a těžké půdy [58,65,93,94,115,161].

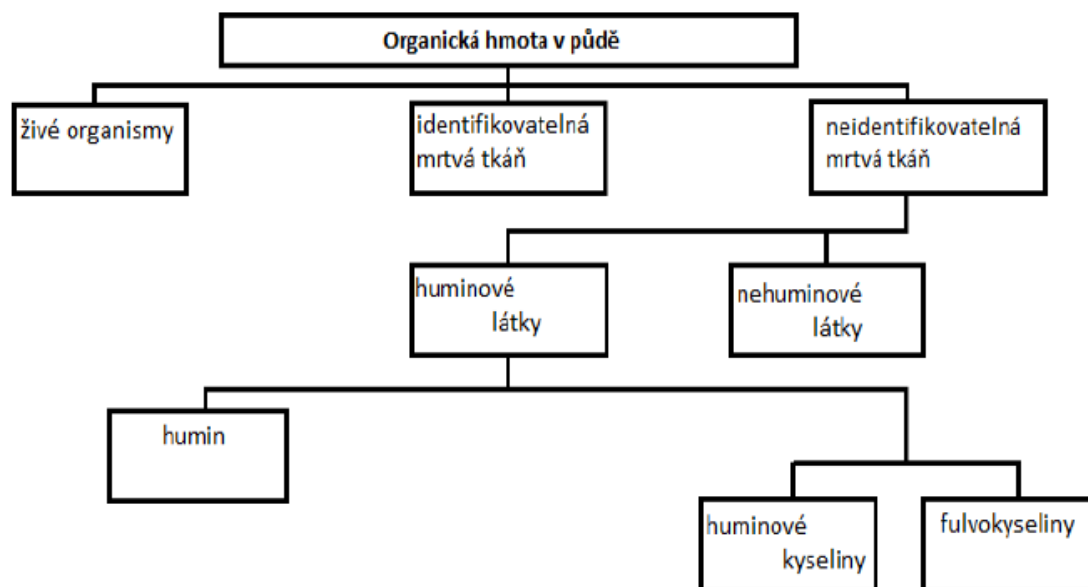
Významným půdotvorným prvkem při stabilizaci a rekultivaci výsypky je také vegetační pokryv, přičemž v závislosti na stádiu sukcese a tím i stáří samotného substrátu výsypky se pH půd snižuje a klesá obsah sodíku a vápníku a naopak obsahy dusíku, uhlíku, draslíku a fosforu rozpuštěného ve vodě se zvyšuje [58,138,161]. Spontánní tvorba půd na výsypkách je významně ovlivňována rostlinnou biomasou, která opadem vrací půdní živiny zpět a dochází k akumulaci půdní organické hmoty, která je rozkládána reducenty (např. bakterie, houby), jejichž metabolickými procesy vzniká vrstva humusu, na jejíž tvorbě se podílí také kořeny (vylučující navíc organické kyseliny pomáhající rozrušovat horninu) fungující ve vznikající půdě jako drenážní systém a významné je i promíchávání opadu s minerální vrstvou půdní mikroflórou a makrofaunou [54,55,115,161]. Půdní fauna je výrazně ovlivňována pH, neboť vývoj většiny mikroorganismů probíhá v rozmezí pH 4 až 9, v případě acidofilních mikroorganismů může být pH i nižší než 1 [13]. Na výsypkách hnědouhelných lomů mohou být, kromě biogenních prvků, také stopové koncentrace toxických prvků, např. Hg, Pb, As, Ni, Cu a jelikož pH výsypkových substrátů někdy vykazuje extrémní hodnoty, mohou vznikat zeminy s fytotoxickými vlastnostmi problematickými pro rekultivace [26,64,138,162]. Humusová vrstva je znatelná až po cca 24 letech od rekultivace a vznik půdy je ovlivňován také reliéfem výsypky, její nadmořskou výškou, expozicí ploch a členitostí terénu, neboť tyto parametry formují vodní režim, erozi a celkové mikroklima. Podzemní voda na výsypkách má nepříznivý vliv, vegetační kryt zvyšuje infiltraci vody a snižujícím volný odtok [58,115,161].

### **2.2.1 Zvětrávání výsypkových substrátů**

Půdy na výsypkách jsou tvořeny, nezávisle na charakteru, rozpojenými horninami. Významný pro vodní režim a chemismus substrátů je zde podíl zvětralin o velikosti pod 2 mm, vznikajících fyzikálním zvětráváním, které je, zejména v případě šedých zpevněných jíílů či jílovců a cyprisových jíílů, poměrně rychlé za vzniku tzv. lístkové struktury a bahenních trhlin, podle nichž se dále rozpadají. Stejným zvětráváním, avšak výrazně pomaleji, prochází také ostatní jílové a hlinité sedimenty, spraše a písky, které již zvětráváním v minulosti jednou prošly. Na výsypkách dochází rovněž k chemickému zvětrávání v závislosti na typu horniny, zvětralé primární minerály se přeměnily na sekundární a stejně tak tercierní sedimenty již prošly hlavním zvětráváním. Dále pokračuje zvětrávání organominerálních cementačních tmelů lístkových struktur sedimentů jíílů, přičemž významným prvkem těchto tmelů je např. dvojmocné železo obsažené v sideritu ( $\text{FeCO}_3$ ), které vlivem kyslíku a vody oxiduje na trojmocné, což se projevuje hnědnutím, přičemž se cementační tmely s obsahem železa a manganu rozpadají. Čím vyšší je obsah organické hmoty v jíílech, tím vyšší je i obsah montmorillonitu, což zvyšuje odolnost lístkových struktur vůči rozplavování elementárních částic. Na místech styku jíílů a uhelné sloje dochází ke vzniku tzv. uhelných jíílů s obsahem síry a jejích sloučenin a také příměsí toxických kovů. Na výsypkách dochází vlivem zvětrávání k oxidaci pyritu ( $\text{FeS}_2$ ) za vzniku síranu železnatého ( $\text{FeSO}_4$ ) a kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), při níž může dojít k samovznícení uhlí, neboť jde o reakci exotermickou, navíc vlivem okyselení dochází ke zvětrávání sideritu v cementech [93,94,138,161].

### **2.2.2 Půdní organická hmota a její význam**

Půdní organická hmota zaujímá v půdě cca 2 až 5 % celkové hmotnosti a jedná se o složitou směs látek zásadním způsobem ovlivňující vlastnosti půdy a živé organizmy v ní žijící [4,173]. Opad nadzemních částí rostlin a odumřelé podzemní orgány rostlin, které je možné rozpoznat, se označují jako tzv. „identifikovatelná mrtvá tkáň“, neboli detritus. Oproti ní se nerozlišitelná amorfní a koloidní směs, tvořená složitými organickými látkami, např. huminovými a nehuminovými, označuje jako půdní humus nebo „neidentifikovatelná mrtvá tkáň“. Nehuminové látky, např. polysacharidy a polymery se stavbou podobnou cukrům, tvoří 20 až 30 % půdní organické hmoty a vznikají činností mikroorganismů. Huminové látky jsou tmavé, vysokomolekulární látky (2000 až 300 000 g/mol) složité struktury, nepodléhající vlivem své velikosti rozkladu mikroorganismy, dělí se na huminové kyseliny, fulvokyseliny a humin [28,129,147,139]. Rozdělení organické hmoty v půdě znázorňuje Obr. 3.



**Obr. 3:** Rozdělení organické hmoty v půdě [28]

Půdní organická hmota je zásadním zdrojem živin, především je významná pro koloběh uhlíku, síry, dusíku a fosforu, což jsou limitující prvky [28,163,178]. Zlepšuje chemické (např. pufruční kapacita) a fyzikální vlastnosti, jako je pórovitost a tím schopnost infiltrace vody s rozpuštěnými živinami i biologickou kvalitu půd [28,117], neboť je zdrojem energie půdních mikroorganismů a potravy heterotrofních společenstev a rovněž má vliv na vznik půdních agregátů [32,141].

### **2.2.3 Akumulace organické hmoty na výsypkách**

Akumulace organické hmoty v půdě je řízena rychlostí mineralizace a humifikace a rozumí se jí proces hromadění humusotvorného materiálu, tvořeného rostlinnými i živočišnými zbytky, produkty a meziprodukty rozkladu i syntézy, jako jsou organické kyseliny, aminokyseliny, proteiny, peptidy, sacharidy apod. a humifikovanou organickou hmotou, tzv. humusem. Humifikace je výrazně ovlivněna rozkladnými i syntetickými procesy půdních mikroorganismů za vzniku meziproductů, které jsou dále humifikovány nebo mineralizovány a uvolňuje se energie pro rozklad až na oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), oxid siřičitý ( $\text{SO}_2$ ) a amoniak ( $\text{NH}_3$ ) [92,106,117,178].

Rychlost akumulace je ovlivněna podnebím, odtokem, strukturou půdy, vegetací i způsobem provedené rekultivace [27,32], především ale stářím výsypky, kdy v prvních letech je vlivem nedostatku přísunu opadu, ještě nerozvinuté vegetace, velmi pomalá [80], s postupným rozvojem vegetačního pokryvu dochází ke zrychlování tohoto procesu.

Zeminy na výsypkách obsahují určité množství fosilního uhlíku, avšak neobsahují téměř žádný recentní organický uhlík. V závislosti na hloubce se rychlost akumulace snižuje, uhlík se nejvíce hromadí ve svrchních částech půdy díky přísunu opadu, přičemž u opadavých porostů je tento proces výraznější [27,44,92,126,143]. K nejvyšší akumulaci organické hmoty a tím přísunu uhlíku, dochází u listnatých lesů v rozmezí 5 až 10 let a v případě jehličnatých lesů po 30 až 40 letech od rekultivace výsypky, po této době dochází vlivem snížení přísunu opadu na starších plochách s větším korunovým zápojem k pomalému snižování rychlosti akumulace, nepodařilo se však prokázat přímou statistickou závislost míry akumulace organické hmoty na typu vegetace. Akumulace organické hmoty je také ovlivňována teplotou a studie potvrdily, že např. na plochách s jehličnatými porosty akumulace s rostoucí teplotou klesá, proto by měly být jehličnany v rámci rekultivací vysazovány na chladnějších místech, listnaté porosty naopak na plochách teplejších [4,142,155,174].

Obsah organické hmoty lze během rekultivačních prací navýšit ornicí s průměrným obsahem 2 až 5 % organické hmoty, který je však vlivem deponování na skrývce nižší, neboť navršením materiálu vznikají anaerobní podmínky omezující mikrobiální aktivitu, navíc se působením velkého tlaku rozpadají půdní agregáty a při rozebrání skrývky ornice za účelem rekultivace je pak organická hmota v nich uložená rychle oxidována a rozkládána mikroorganismy, jejichž respirací dochází ke ztrátě uhlíku [65,66,91,173,182]. Deponací ornice a následnou manipulací se skrývkou se koncentrace půdního organického uhlíku může snížit cca o 32 až 85 % oproti původnímu obsahu [1,6].

#### **2.2.4 *Formy humusu***

Profil nadložního (pokryvného) humusu popisuje uspořádání svrchních částí půdy do kategorií podle charakteristiky organických horizontů, složených z rozkládající se, zejména rostlinné, biomasy, která může procházet procesem humifikace, karbonizace, ulmifikace nebo mineralizace. V případě nedostatečně rychlého procesu dekompozice a následné mineralizace se odumřelá organická hmota hromadí na povrchu půdy a vzniká vlastní nadložní organický horizont a látky v něm obsažené poskytují vysoce eneregetický substrát pro půdní mikroorganismy. Kvalita humusu je dána poměrem uhlíku a dusíku (C/N), který čím je nižší, tím je kvalita humusu vyšší a tento poměr může být zvyšován např. vlivem eluviace podporující degradační procesy. C/N poměr se v mírném pásmu pohybuje v rozmezí 7 až 17. Důležitým parametrem je mocnost a kvalita nadložní humusové vrstvy významně ovlivňující teplotní, vodní a vzdušné poměry a tím také strukturu povrchových A-horizontů [18,49,166].

Nadložní horizonty lze podle mocnosti a charakteru rozlišit na vlastní opad od horizontu drti, tzv. fermentační horizont a ten dále od horizontu měli, tzv. humifikační horizont. Opad, neboli horizont Ol, je tvořen listím, jehličím a kůrou neprocházející intenzivním rozkladem, drť, neboli horizont Qf, je charakterizován probíhající dekompozicí s částečným rozkladem organických zbytků bez ztráty původní struktury a tvaru. Horizont měli, neboli horizont Oh, tvoří tmavou organogenní vrstvu v pokročilém stádiu humifikace, kdy organické zbytky pozbyly původní struktury a charakteru. Pod vrstvou čistě organického nadložního humusu se nachází humusový A-horizont (viz. Obr. 4) s minerální složkou vázanou k organické složce půdy. Nadložní humus se dělí na čtyři základní formy (které se ještě dělí na subformy se specifickými znaky), a to na surový humus, tzv. mor, moder neboli drť, mull nebo také měl (tzv. sladký humus) a tangel vázaný na vysokohorská krasová území.

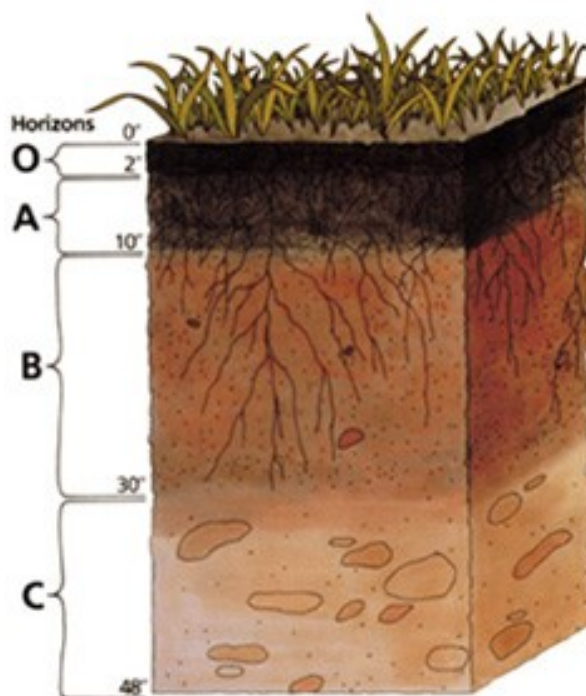
Surový humus, neboli mor, je typický pro oblasti vyšších poloh, s chladným a vlhkým mezoklimatem s nedostatkem opadu, v němž dominují jehličnany a acidofilní rostliny, např. vřes, jehož kořeny podporují endomykorhizu s askomycetami, brusnicovité, lišejníky, mechy a minerálně chudým půdotvorným substrátem s nízkým nebo vysokým obsahem jílu, kyselým prostředím, nevhodným pro dekompozici, kde se mrtvá nehumifikovaná organická hmota akumuluje na málo provzdušněném, zamokřeném půdním povrchu. Aktivita organismů a druhová diverzita je zde nízká, přičemž rostliny převažují nad mikroorganismy a půdními živočichy. Na rozkladu organické hmoty se podílejí zejména plísňe a houby, zooedafon, jako např. roztoči a chvostoskoci, pak jen minimálně. Vlivem fulvokyselin nedochází k prohumóznění horní vrstvy půdy a často dochází k podzolizaci [18,21,49,132,166].

Moder, neboli drť, je přechodná humusová forma mezi morem, kterému se podobá akumulací organického materiálu na povrchu půdy, ale liší se od něj nižší mocností nadložních horizontů a méně znatelným horizontem drti a mullem, jemuž je blízký dominancí dekompozice půdní faunou, ale liší se od něj souvislým nebo nesouvislým horizontem měli, v němž humikací mikroedafonem ztratí mrtvá organická hmota původní strukturu, ale ještě netvoří organominerální komplex se zvětralým substrátem. Vzniká pod jehličnany i listnatými porosty za klimatických a půdních podmínek příznivějších než u moru, proces humifikace je zde pomalejší, ale rozsáhlejší a mocnost horizontu je silnější, bývá dobře vyvinutý s nesoudržnou kyprou strukturou s obsahem částečně rozložených zbytků rostlin. Dekompoziční procesy zde probíhají v kyselém prostředí mikrobiální biomasy tvořené především plísněmi a houbami, vylučujícími antibiotika ničící bakterie, za účasti makrofauny, zejména členovců, žížaly se vyskytují jen zřídka, proto je pórovitost a promíchávání organické hmoty omezeno.



Dochází k hromadění organických látek ve třech horizontech, a to v horizontu OL s obsahem celých listů a jehlic, dále horizontu OF, neboli fragmentovaného opadu a horizontu OH, tedy humifikovaného opadu [18,49,132,166].

Mull nebo také měl je typický pro propustné, vlhké půdy mírného až teplého klimatu bohaté na živiny s listnatými i smíšenými porosty, kde vzniká akumulací organické hmoty na povrchu půdy, kdy dochází k rychlému rozkladu a transformaci zbytků odumřelé organické hmoty a uvolněním energie do koloběhu. Tato tmavě zbarvená forma humusu s vysokým obsahem uhlíku, homogenní směsí humifikovaných organických látek a minerálů, tvořících makroagregáty, je velmi pórovitá a provzdušněná promícháváním zooedafonem (makro-, mezo- i mikrofaunou), především žížalami, které produkují značné množství koprogenních elementů tvořících drobtovitou strukturu dobře vyvinutého horizontu A, ale také bakteriemi a aktinobakteriemi, které v mikroflóře zastupují houby. Mull díky značnému opadu, rychlému koloběhu živin, půdní fauně a kořenům listnatých i smíšených porostů s keři a bylinným patrem, produkujícím kořenové exudáty, podporuje vysokou úrodnost půd [49,110,132,166].



**Obr. 4:** Základní diagnostické horizonty [37]  
O – nadložní organický horizont, A – humusový horizont,  
B – metamorfický horizont, C – půdotvorný substrát

### 3 MASTNÉ KYSELINY

#### 3.1 Klasifikace mastných kyselin

Mezi složené (komplexní) lipidy se řadí glykoacylglyceroly, patřící k nejdůležitějším částem membrán rostlin, sfingolipidy s dlouhým aminoalkoholovým řetězcem a dále gangliosidy a cerebrosidy obsažené v membránách mozkových a nervových buněk. Do této skupiny náleží také fosfoacylglyceroly neboli fosfolipidy [113,148].

Fosfolipidy, základní esenciální stavební a funkční složka membrán buněk, tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu buněčných membrán [87,99]. Vlivem obsahu fosfolipidových mastných kyselin má amfifilní molekula fosfolipidu schopnost vést při fyziologickém pH elektrický náboj, což je velmi důležitá vlastnost umožňující v buněčných membránách biologické funkce. V současnosti se mastné kyseliny fosfolipidů využívají pro studium ekologie mikrobiálních společenstev, odhadu biomasy a získání přehledu o jejich diverzitě a struktuře [113,148,188]. Faktory vnějšího prostředí mikroorganismů mohou vyvolávat kvalitativní a kvantitativní změny složení fosfolipidů i struktury mikrobiálních společenstev. Pro jejich hodnocení lze využívat určité měřitelné parametry měnící se vlivem stresoru v mikrobiální populaci [39,77,189].

#### 3.2 Názvosloví mastných kyselin

Názvosloví mastných kyselin používá názvů systematických i triviálních ve spojení se symbolikou ve tvaru „vCC:X $\omega$ Yt“, kde „CC“ značí počet atomů uhlíku v molekule, „X“ pak počet dvojných vazeb, „ $\omega$ “ udává polohu dvojných vazeb vůči alifatickému řetězci (př. 16:1 $\omega$ 7 označuje kys. cis-9-hexadecenovou neboli palmitolejovou, 18:2 $\omega$ 6,9 označuje kys. cis,cis-9,12-oktadidecenovou neboli linoleovou) a písmeno „t“ znamená „trans“ konfiguraci na dvojně vazbě (př. 16:1 $\omega$ 7t znamená kys. trans-9-hexadecenová neboli kys. palmitelaidová). Větvení „i“ označuje „iso“ mastné kyseliny s methylovou skupinou na předposledním uhlíku alifatického konce (př. i17:0 znamená kys. 15-methylhexadekanová), větvení „a“ značí „anteiso“ mastné kyseliny s methylovou skupinou na třetím uhlíku alifatického konce (př. a17:0 označuje kys. 14-methylhexadekanovou), „cy“ označuje mastné kyseliny s cyklopropylovým kruhem (př. cy19:0 znamená kys. 9-methylenoktadekanová). Jiná větvení se pak vyjadřují standardními předponami chemického názvosloví (př. 10Me-16:0 znamená kys. 10-methylhexadekanová, 3OH-14:0 znamená kys. 3-hydroxytetradekanová) [99].

### 3.3 Fosfolipidové mastné kyseliny (PLFA)

Fosfolipidové mastné kyseliny (Phospholipid Fatty Acids – PLFA) - mnohuhlíkaté alifatické monokarboxylové kyseliny, jsou základní složkou jednoduchých, složených i odvozených lipidů, obsažených ve specificky strukturovaných membránách buněk, jako např. fosfatidylcholinů, fosfatidylethanolaminů, fosfoinositolů, bisfosfatidylglycerolů, sfingomyelinů a sterolů, shlukujících se ve vodném prostředí do tzv. micel, a proteinů v různém poměru dle funkce membrány, jejichž součástí jsou také sacharidy (glykolipidy, glykoproteiny) tvořící až 10 % hmotnosti buněčných membrán [113,148,154].

Základní částí biomembrány je lipidová dvojvrstva, která vzniká esterifikací molekulou glycerolu, který se váže dvěma OH skupinami na dva řetězce mastné kyseliny, čímž vzniká hydrofobní (nepolární) část molekuly fosfolipidu, hydrofilní (polární) část molekuly pak vzniká navázáním kyseliny fosforečné na třetí OH skupinu glycerolu [77,87,99]. Interakce, které drží hydrofobní a hydrofilní část pohromadě, jsou výhradně nekovalentní. Bílkoviny připojené k této dvojvrstvě zajišťují aktivní a specifické funkce. Jelikož je za fyziologické teploty tato membrána kapalná, neboť lipidy tvořící dvojvrstvu nevytváří mřížku a mohou volně rotovat, lze lipidovou dvojvrstvu označit za dvojrozměrnou kapalinu [101,148].

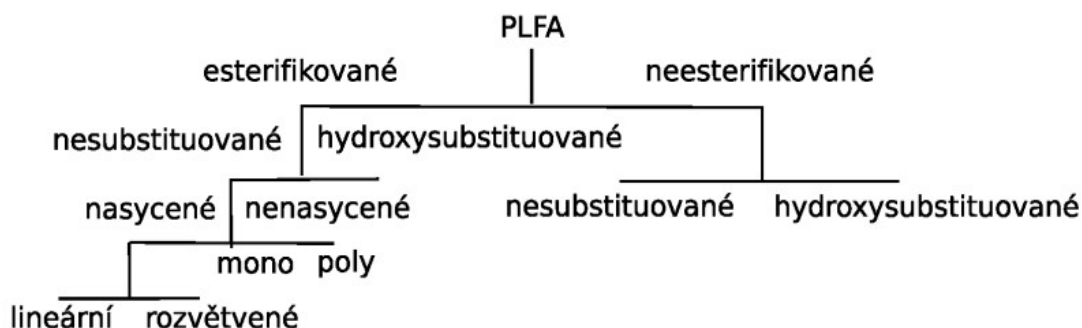
Fosfolipidy podléhají po smrti buňky, v řádu minut až max. hodin, rozkladu, proto je nelze nalézt mezi zásobními lipidy, což však umožňuje použít celkový obsah, především esterifikovaných, PLFA ve vzorku jako indikátor množství živých buněk mikrobiálního společenstva [50,76,120,187]. Snížení obsahu PLFA tedy indikuje působení environmentálního stresu na testované mikroorganismy. V každém organismu existují specifické typy PLFA, tzv. biomarkery, sloužící k identifikaci skupin mikroorganismů či vytvoření profilu mikrobiálního společenstva [87,120,127].

#### 3.3.1 Dělení fosfolipidových mastných kyselin

Fosfolipidové mastné kyseliny se dělí na dvě základní skupiny, jimiž jsou esterifikované mastné kyseliny, tvořící 60 - 90 % mastných kyselin obsažených v membránách buněk a neesterifikované mastné kyseliny, jejichž obsah činí od 10 do 40 %. Esterifikované mastné kyseliny i neesterifikované mastné kyseliny se dále shodně dělí na nesubstituované a hydroxysubstituované, přičemž pouze esterifikované nesubstituované mastné kyseliny se pak ještě dělí na nasycené, které obsahují pouze jednoduché vazby zajišťující vyšší chemickou stabilitu a bod tání, a na nenasycené (mono-, di- a polynenasycené), s jednou či více dvojnými vazbami chemickou stabilitu a bod tání snižujícími.

Dále se dělí dle charakteru uhlíkového řetězce na nerozvětvené (kterých je většina), rozvětvené či alicyklické a s konfigurací dvojných vazeb „cis“ nebo „trans“. Dělení PLFA je znázorněno na Obr. 5 [77,113,148].

Pro každou skupinu běžných mikroorganismů v půdních substrátech jsou charakteristické skupiny PLFA či poměry jejich zastoupení, které mohou být podmíněny přirozenými i antropogenními faktory, u nichž, jsou-li identifikovány, lze v případě nerovnováhy v optimálním poměru predikovat podobný vliv např. xenobiotika či antropogenního narušení jako na testovací půdě [77]. Např. pro bakterie jsou specifické větvené PLFA, na rozdíl od organismů eukaryotických, pro něž jsou specifické polynenasycené mastné kyseliny, přesto však ve většině případů PLFA není reprezentativní z hlediska druhové úrovně [102,120].

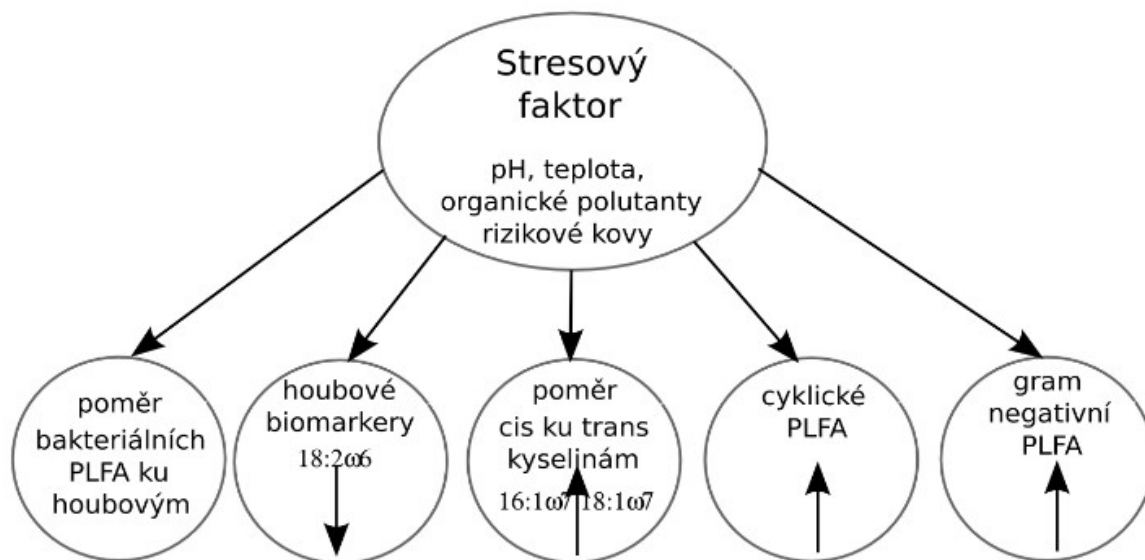


**Obr. 5:** Dělení fosfolipidových mastných kyselin [77]

### 3.3.2 Bakteriální PLFA

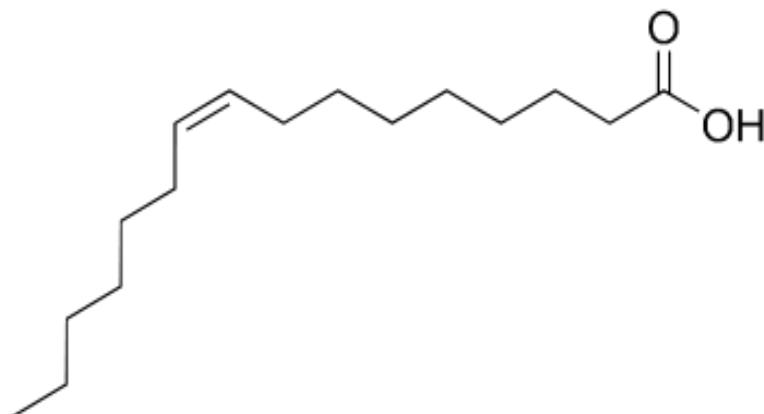
Vlastnosti PLFA umožňují jejich využívání k indikaci obecného environmentálního stresu (viz. Obr. 6), neboť jsou přítomny především v buněčných membránách, díky čemuž je možné změnou jejich koncentrace indikovat intracelulární a extracelulární změny, např. obsah těžkých kovů, pH, nedostatek živin, změnu teploty atd., které způsobují změnu konzistence membrány vyvolávající nárůst její fluidity, ovlivňující její průchodnost. Změna složení PLFA nárůst fluidity membrány neutralizuje např. izomerizací „cis“ nenasycených mastných kyselin (16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7c) na „trans“ nenasycené (16:1 $\omega$ 7t, 18:1 $\omega$ 7t) s těsnějším uspořádáním v membráně a právě tato změna poměru cis/trans mononenasycených mastných kyselin indikuje přítomnost stresoru [99]. Přítomnost obecného environmentálního stresu je možné indikovat také pomocí poměru obsahů nasycených a nenasycených mastných kyselin (12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 / 14:1 $\omega$ 5c + 15:1 $\omega$ 6c + 16:1 $\omega$ 7c + 16:1 $\omega$ 5c + 17:1 $\omega$ 9c + 18:1 $\omega$ 9c + 18:1 $\omega$ 7c), jelikož mezi adaptační mechanismy membrán patří saturace nenasycených mastných kyselin, k čemuž dochází např. při nedostatku vody.

Biotické a abiotické stresory také mění poměr bakteriálních (i14:0; i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a 17:0i6:1ω9c, 18:1ω9c, 15:1ω4c, 18:1ω7c, 17:1ω9c) a houbových kyselin (18:2ω6c) [77,114].

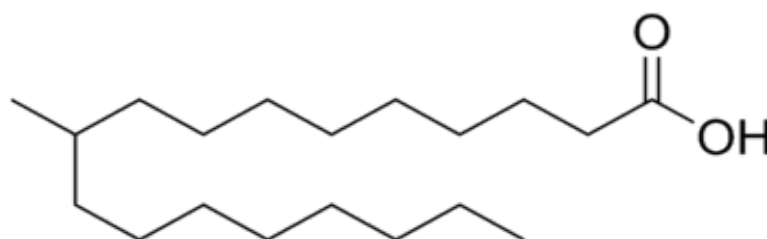


**Obr. 6:** Indukce změn ve struktuře PLFA různými stresovými faktory [77]

Gram-negativní (G-) bakterie obsahují v buněčné stěně lipopolysacharidy tvořené neesterifikovanými hydroxysubstituovanými mastnými kyselinami. Přítomnost např. těžkých kovů nebo pesticidů výrazným způsobem přispívá ke snižování koncentrace G- PLFA, stejně jako v případě PLFA hub. G- bakterie jsou na rozdíl od Gram-pozitivních (G+) bakterií méně citlivé na změny v životním prostředí, což umožňuje změny poměru G- a G+ bakterií využít k indikaci znečištění. Bylo zjištěno, že v kontaminovaných půdách se počet Gram-pozitivních bakterií snižuje a u Gram-negativních se nemění, což je vysvětlováno obsahem stabilnějších mastných kyselin s cyklopropanovým kruhem a lipopolysacharidů v membránách [77]. Cyklopropanové mastné kyseliny vznikají adicí methylenové skupiny na nenasycené kyseliny při přechodu G- bakterií z exponenciální do stacionární fáze růstu, který mohou vyvolávat různé faktory, nejčastěji nedostatek živin nebo vody, kdy při vysušení půdy roste poměr obsahu cy/pre (cyklopropylových PLFA a jejich prekurzorů), indikující nutriční stres. Mezi poměrem cy/pre a koncentrací houbové PLFA (18:2ω6,9) byla prokázána nepřímá závislost [9,99], přičemž byly při nižším poměru naměřeny vyšší koncentrace houbové PLFA, indikující metabolickou spolupráci bakterií s houbami [43]. Vzorci zástupců bakteriálních PLFA jsou znázorněny na Obr. 7 a 8.



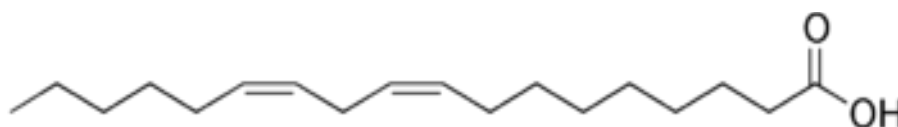
**Obr. 7:** Palmitolejová kyselina, PLFA biomarker pro Gram-negativní bakterie [124]



**Obr. 8:** Tuberkulostearová kyselina, PLFA biomarker pro druhy aktinobakterií [124]

### 3.3.3 Houbové PLFA

Houby jsou významnou součástí půdního ekosystému, neboť dekompozicí zbytků rostlin uvolňují živiny důležité pro kvalitu vlastností půdy. Přítomnost environmentálního stresoru (např. pesticidy, těžké kovy apod.) odráží celkový pokles houbové biomasy s níž zároveň klesá i koncentrace specifické houbové PLFA (tzv. signature fatty acids: 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 7), která tak slouží jako indikátor stresu [99]. PLFA specifické pro houby lze výběrem vhodné metody rozlišit na ty, které pochází z membrán buněk a slouží ke kvantifikaci biomasy mycelia a na ty, pocházející ze zásobních triglyceridů, které informují o jeho fyziologickém stavu. Biomasa je takto stanovována a vyhodnocena celkově bez rozlišení taxonů hub [70]. Příklad houbové PLFA uvádí Obr. 9.



**Obr. 9:** Kyselina linolová, PLFA biomarker pro houby [124]

Poměr houbové a bakteriální PLFA je využíván jako indikátor přítomnosti environmentálního stresu, např. nedostatku půdních živin, způsobujícím snižování obsahu SMB [114]. Bylo prokázáno, že vyššími hodnotami poměru houbové a bakteriální PLFA se vyznačují nehnosené a antropogenně neovlivněné půdy oproti pravidelně obhospodařovaným půdám [99]. Půdy o vysokém obsahu organické hmoty vykazují poměr v rozmezí 0,3 - 0,5 a u půd s nízkým obsahem se pak tento poměr pohybuje v rozmezí 0,02 - 0,04 [51].

### 3.3.4 Analýza půdních mikrobiálních společenstev pomocí PLFA

Kvantitativní analýzu půdních mikrobiálních společenstev je možné provést mnoha metodami, které však poskytují jen časově náročné obecné stanovení. Citlivá metoda vyhodnocování mastných kyselin specificky vázaných na polární lipidovou frakci půdních mikroorganismů, analýza PLFA [89], které slouží jako bioindikátory přítomnosti stresorů specifických skupin organismů přírodních i antropogenních, je nejvhodnějším způsobem provedení relativně rychlé analýzy velkého množství vzorků [51,77,187]. PLFA je možné z mikrobiálních buněk dobře extrahovat a jejich pomocí lze popsat přítomnost i množství jednotlivých mikroorganismů či celých společenstev, u nichž jsou tyto, jako biomarkery sloužící látky, zjištěny [23,76,87].

Hodnocení analýzou PLFA umožňuje pomocí celkové koncentrace PLFA detekovat v půdě jen živou mikrobiální biomasu, což znamená, že jsou-li PLFA změřeny v nízkém obsahu, živé SMB daného stanoviště stagnuje. Analýza PLFA využívá fosfolipidových mastných kyselin jako biomarkerů indikujících přítomnost a množství různých mikroorganismů (hub, G- a G+ bakterií, aktinobakterií apod.) s výjimkou *Archea*, co se týká taxonomie, neboť jejich mastné kyseliny se liší od bakterií etherovou vazbou. Následující Tab. 2 uvádí konkrétní biomarkery zjištěné analýzou čistých kultur mikroorganismů, jejichž použití však není zcela jednotné [51,87,99,102].

**Tab. 2:** Biomarkery významných skupin půdních organismů [99]

Skupina mikroorganismů	Biomarker
Bakterie	16:1 $\omega$ 7t, 16:1 $\omega$ 9, 18:1 $\omega$ 7, 17:0
G+ bakterie	i14:0; i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a17:0
G- bakterie	cy17:0, cy19:0, 15:1 $\omega$ 4c, 16:1 $\omega$ 5c, 17:1 $\omega$ 9, c18:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 9c
Aktinobakterie	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0
Houby	18:2 $\omega$ 6c

Při analýze PLFA jsou nejdříve jednofázovou směsí rozpouštědel extrahovány celkové lipidy ze vzorku půdy, získaná směs se dále na vakuové odparce zahustí, poté proběhne frakcionace extrakcí na tuhé fázi se silikagelem, který slouží jako absorbent, na jednotlivé frakce polárních lipidů, neutrálních lipidů, glykolipidů a fosfolipidů. Oddělené fosfolipidy dále prochází alkalickou methanolýzou za účelem získání methylesterů mastných kyselin, tzv. FAME, které se stanovují pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Metoda FAME však na rozdíl od PLFA bere v úvahu i lipidy mrtvé organické hmoty včetně zásobních, používá menší vzorek a je rychlejší. PLFA oproti tomu umožňuje lepší reprodukovatelnost výsledků [89,103,119].

Profil PLFA, který je tímto způsobem získán, podává informace o relativní abundanci populací společenstev, jejich složení i stavu z hlediska fyziologie. Např. nedostatek živin nebo jiný stresor zvyšuje poměr cis/trans izomerů mononenasycených PLFA, nenasycených a nasycených mastných kyselin a také cyklopropylových mastných kyselin a jejich mononenasycených prekurzorů [102].

Analýza PLFA používá tři základní metody, a to buněčnou, celkovou a rozšířenou analýzu. Buněčná analýza PLFA je v současnosti široce používanou metodou zejména během extrakce PLFA z čisté kultury, neboť se jedná o relativně rychlou a nenáročnou metodu analýzy celkových, tj. membránových a zásobních, lipidů. Ke kvantitativní analýze obsahu PLFA v odebraných vzorcích je nejvíce využívána, relativně jednoduchá metoda, tzv. celkové analýzy PLFA, jejíž nevýhodou je ale alkalická methanolýza, kterou, ačkoli je citlivá vůči postranním řetězcům, nelze extrahovat methylestery z neesterově vázaných mastných kyselin. Další metodou je tzv. rozšířená analýza PLFA, která, jak název napovídá, postup celkové analýzy PLFA rozšiřuje o extrakční techniky, které dělí mastné kyseliny na frakce podle chemicky významných skupin, v dalším kroku analyzovaných plynovou chromatografií. Její pomocí lze stanovovat vzácnější mastné kyseliny, i ty neesterově vázané [87,99].

### **3.3.5 Limitace analýzy PLFA**

Metoda analýzy PLFA však skýtá jistá omezení, jako např. nemožnost přiřazení konkrétního mikroorganismu či skupiny mikroorganismů ke specifické mastné kyselině v půdním vzorku v případě neznalosti vhodné indikátorové molekuly, proto touto metodou nelze charakterizovat druh. Dalším omezením metody je založení analýzy, pro účely hrubého stanovení struktury společenstev, na biomarkerech mastných kyselin, protože každá jejich změna může vést k nepřesným odhadům.



Houby i bakterie produkují odlišná množství PLFA a jednotlivé mastné kyseliny se navíc liší v závislosti na růstových podmínkách a vlivu environmentálního stresu. PLFA biomarkery nemusí být vždy jedinečné pro dané skupiny, jakkoli mohou korelovat s výskytem určitých skupin mikroorganismů, což také může způsobovat nepřesnosti v určování biomarkeru společenstva. V neposlední řadě je, v případě biomarkerů, také nevýhodná nízká taxonomická specifikace z důvodu širokých funkčních skupin [76,87].

### **3.3.6 Využití analýzy PLFA v jiných studiích**

Analýza PLFA je kultivačně nezávislou metodou hodnocení struktury mikrobiálních společenstev v půdách a stanovení změn půdy, např. znečištění a kvalita, je široce využitelná, její pomocí byla studována např. problematika rozdílů mikrobiálních společenstev související s Rhizoctoniovým vadnutím [76,170]. Na základě studií organicky řízených půd, tzn. bez používání syntetických hnojiv a pesticidů, byly sestaveny profily PLFA značně odlišné od profilů z půd obhospodařovaných klasickým způsobem s využitím syntetických hnojiv a pesticidů. Na ekologicky obhospodařovaných půdách bylo prokázáno obohacení o i14:0, a15:0, 16:1ω7c, 16:1ω5c, 14:0, a 18:2ω6c mastné kyseliny, značící vyšší diverzitu aerobních bakterií, bakterií oxidujících methan i populací sinic. Dané studie dokazují významnost analýzy PLFA pro stanovení hrubých změn mikrobiálních společenstev v souvislosti se způsoby obhospodařování půd [23].

Výzkum mikrobiální aktivity v souvislosti se stářím sukcese na lokalitách po těžbě hnědého uhlí ponechaných sukcesnímu vývoji potvrdil zvyšování mikrobiální biomasy i bakteriální diverzity na plochách do věku 21 let, zatímco starší sukcesní stádia vykazovala mikrobiální biomasu a bakteriální diverzitu vyšší v počátečních a konečných fázích sukcesního vývoje za současné dominance bakterií nad houbami. Např. šest let staré sukcesní plochy bez vegetačního pokryvu se bakteriálními společenstvy, zejména druhy *cyanobakteria* a *gammaproteobakteria*, značně lišily od ploch starších s přítomností vegetace, na nichž byla také zjištěna významnější závislost bakterií na změnách zásob živin a pH a také přírůstek acidobakterií a úbytek aktinobakterií [171].

Metodou PLFA byla studována závislost na nedostatku půdní vláhy a bylo zjištěno, že pro mikrobiální společenstva má nedostatek vláhy zanedbatelný vliv a naopak větší vliv má klima (Řecko x Německo) a typ opadanky (borovice x jedle). V případě jedlové opadanky sice převládaly bakterie nad houbami, ale během čtyř měsíců monitorování obě společenstva průměrně vykazovala pokles.

Nedostatek vláhy se výrazně neprojevil, pro průběžně zavlažovaná společenstva bakterií a hub byla vyhodnocena jen slabá závislost. Bakteriální společenstva spojená s odumřelou hmotou jehličnanů vykazují citlivost na změny klimatu více, než na půdní vláhu [183].

Čínští vědci pomocí analýzy PLFA studovali rozdíly v mikrobiálních společenstvech podle orientace ke světovým stranám (sever x jih), zjištěna byla pozitivní korelace s organickým uhlíkem z huminových kyselin, přičemž na základě částečného biografického rozdělení struktury byla společenstva rozdělena koordinační analýzou do tří skupin. Podařilo se prokázat, že půdy na severu mají vyšší obsah G- bakterií a půdy na jihu více hub [185].

Čtyřletá studie prováděná pomocí analýzy PLFA na lesních půdách, ovlivněných ztrátou organické hmoty a kompakcí, porovnávaných s lesním terénem bez těchto disturbancí, neprokázala mezi nimi významné rozdíly, avšak na ovlivněné lokalitě byl zjištěn nižší obsah nasycených mastných kyselin, na plochách narušených, kde byla teplota půdy o 4 °C vyšší, bylo zjištěno vyšší množství nenasycených mastných kyselin [131].

## **II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



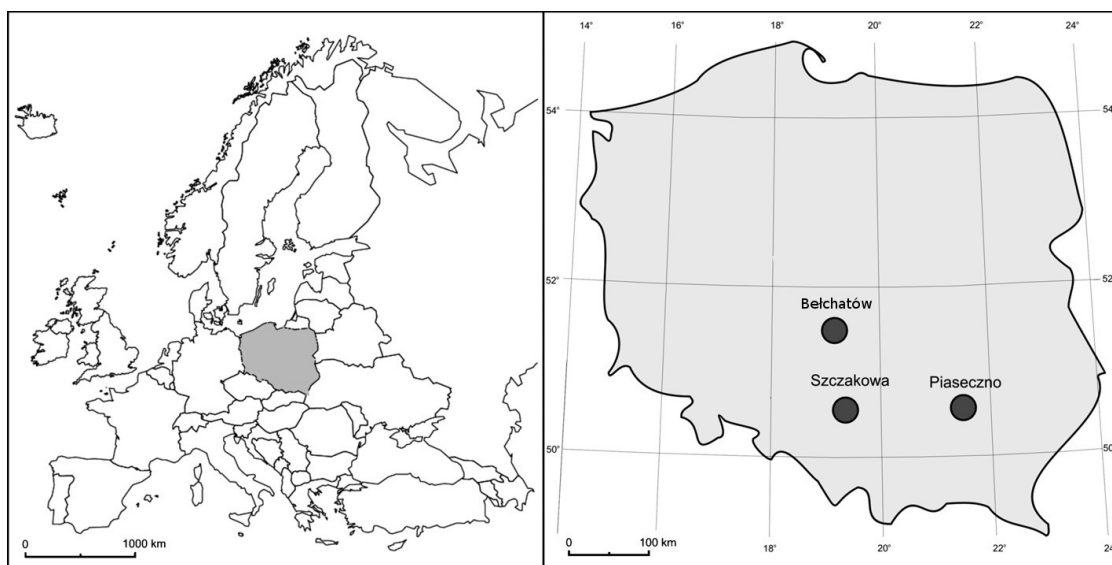
## 4 METODIKA

### 4.1 Charakterizace odběrových míst

Odběrová místa, vyznačená na Obr. 10, se nacházejí na lesnicky rekultivovaných výsypkách, stáří cca 25 let, v Polské republice, a to konkrétně na výsypkách hnědouhelného lomu Bełchatów a pískoven Piaseczno (Obr. 11) a Szczakowa (Tab. 3), na nichž se nachází monokulturní porosty břízy bělokoré (*Betula pendula*), borovice lesní (*Pinus silvestris*), dubu letního (*Quercus robur*) a olše lepkavé (*Alnus glutinosa*).

**Tab. 3:** Souřadnice odběrových míst:

Bełchatów	N 51.24670 E 19.28540
Piaseczno	N 50.33622 E 21.34185
Szczakowa	N 50.25310 E 19.44010



**Obr. 10:** Odběrová místa, upraveno podle [125]



**Obr. 11:** Pískovna Piaseczno

## 4.2. Odběr, zpracování a stanovení vzorků půd

Na odběrových místech bylo odebráno celkem bylo analyzováno 66 reprezentativních vzorků půdy, z toho 33 z vrstvy Oe a 33 z vrstvy A, a to v obou případech po 3 replikacích, tedy na každé lokalitě pod každou stromovou monokulturou (viz. podkapitola 4.1 Charakterizace odběrových míst) byly odebrány 3 vzorky, přičemž na lokalitách Bełchatów a Szczakowa pod všemi výše uvedenými druhy, s výjimkou lokality Piaseczno, kde není přítomna olše. Odebrané vzorky byly zhomogenizovány a zpracovány kvartováním. Vzorky byly poté až do provedení analýzy uchovávány v mrazáku.

### 4.2.1 Příprava vzorků k analýze - extrakce lipidů

Byly naváženy asi 2 g zmrzlé půdy, které byly následně lyofilizovány. Do označených vypálených zkumavek bylo navažováno po asi 1 g přesně vzorku suché půdy. Ke vzorkům půdy bylo do zkumavek přidáno 0,5 ml pufru dihydrogenfosforečnanu draselného ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1,25 ml methanolu ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) a 0,625 ml chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ). Poté byly zkumavky uzavřeny plastovým víčkem s teflonovou vložkou a promíchány na vortexu po dobu 1 minuty. Následně se vzorky nechaly extrahovat 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě, a poté byly vzorky 5 minut centrifugovány (3500 otáček/min) při pokojové teplotě. Supernatant byl odebrán pomocí vypálené skleněné dlouhé Pasteurovy pipety do jiné označené vypálené zkumavky opět uzavřené víčkem s teflonovou vložkou a uchováván ve tmě. K sedimentu bylo přidáno 1,25 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 0,625 ml  $\text{CHCl}_3$ . Vzniklá směs byla promíchána na vortexu po dobu 1 minuty a extrahována za stejných podmínek 1 hodinu. Poté byly vzorky opět 5 minut centrifugovány (3500 otáček/min). Byl odebrán supernatant z druhé extrakce a spojen se supernatantem z první extrakce. Stejným způsobem byla provedena třetí extrakce a nakonec byly spojeny všechny supernatanty z jednotlivých extrakcí. Roztok ve zkumavkách byl následně centrifugován (3500 otáček/min) při pokojové teplotě. Spodní chloroformová část byla pomocí Pasteurovy pipety přenesena do označené vypálené vialky a uzavřena víčkem se septem. K vodné fázi bylo přidáno opět 1,88 ml  $\text{CHCl}_3$  a směs se promíchala na vortexu po dobu 1 minuty. Následovala centrifugace (3500 otáček/min) a poté byla chloroformová část odebrána a spojena s předešlou frakcí.

#### **4.2.2 Frakcionace lipidů ze vzorku pomocí SPE**

Vzorky byly odpařeny do sucha proudem dusíku, rozpuštěny v 300  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$  a promíchány na vortexu. Na SPE (Solid Phase Extraction) kolonku byly nasazeny jehly s otočným uzávěrem, a poté byla kolonka promyta 1,5 ml  $\text{CHCl}_3$ . Následně byl nanesen na kolonku vzorek a poté opět 2 ml  $\text{CHCl}_3$  a ponecháno úplně vykat. Ve třech krocích bylo naneseno 6 ml acetonu ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) vždy po 2 ml a opět ponecháno úplně vykat. Nakonec bylo naneseno 2 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  a do vypálené vialky byly jímány fosfolipidy.

#### **4.2.3 Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace)**

Vzorky byly odpařeny proudem dusíku a bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  methylnonadekanoátu (vnitřní standard  $\text{C}_{19,0}$ ). Opět bylo odpařeno proudem dusíku do sucha. Následně bylo přidáno 0,5 ml toluenu ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{CH}_3$ ) a 0,5 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Směs byla promíchána na vortexu 1 minutu. Byl přidán 1 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v bezvodém  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37 °C ve vodní lázni. Bylo přidáno 1,6 ml hexanu ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), 0,4 ml  $\text{CHCl}_3$ , 0,3 ml 1 M kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) a 2 ml destilované vody. Roztok byl promíchán na vortexu 1 minutu, a poté byl centrifugován (2500 otáček/min) po dobu 10 minut. Horní fáze byla přenesena pomocí Pasteurovy pipety do označené vypálené vialky a spodní fáze (se vzorkem) byla opět promyta 1,6 ml  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  a 0,4 ml  $\text{CHCl}_3$ . Následně byla směs promíchána na vortexu 1 minutu a centrifugována (2500 otáček/min) po dobu 10 minut. Horní fáze byla opět přenesena a spojena s předchozí frakcí. Tento krok byl ještě jednou zopakován a poslední horní fáze byla spojena s předchozími. Vzorky byly uchovávány v mrazáku.

#### **4.2.4 Analýza vzorků pomocí GC/MS**

Těsně před měřením na GC/MS byly vzorky odpařeny do sucha proudem dusíku, naředěny 1 ml  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  a promíchány na vortexu 30 sekund. Poté byl 1 ml vzorku přenesen do 2 ml vialky a uzavřen krimpovacími kleštěmi. Nakonec byl vzorek měřen pomocí GC (Varian 450-GC, Walnut Creek, USA) s hmotnostním detektorem s iontovou pastí (Varian 240-MS, Walnut Creek, USA). K separaci analytů byla použita kapilární kolona DB5-MS (délka 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu\text{m}$  film). Teplota transferline byla 280 °C, teplota iontové pasti 220 °C. První minutu byla ionizace vypnutá, od 1 minuty do 60 minut se sbírají data v hmotnostním rozsahu 50 - 450 m/z (viz. Tab. 4).

**Tab. 4:** Teplotní program použitý při analýze PLFA

Teplota (°C)	Nárůst teploty (°C/min)	Doba setrvání (min)	Celkový čas (min)
60		1	1
120	25	0	3,4
240	2,5	8,6	60

#### 4.2.5 Stanovení ostatních chemických parametrů půdy

Chemické parametry půdy (C, N, C/N, pH (KCl), P dostupný, Ca, K, Mg, CEC, písek, jíla) byly převzaty od polských kolegů z University Life Sciences v Krakově.

#### 4.2.6 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Canoco a Statistica. Chemické parametry půdy a PLFA byly vyhodnoceny pomocí jednofaktorové ANOVA, Tukey post hoc test ( $p < 0,05$ ). PCA a RDA analýza byla použita pro vyhodnocení závislosti mezi jednotlivými skupinami mikroorganismů, chemickými parametry půdy a dominantními stromy na jednotlivých lokalitách.

### 4.3 Chemikálie

Seznam použitých chemikálií uvádí Tab. 5.

**Tab. 5:** Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
methanol absolute pro HPLC Gradient grade 99,9 %	VWR chemicals
chloroform (trichloromethan) pro HPLC 99,8 %	VWR chemicals
aceton pro HPLC-G 99,9 %	Chromservis
N-hexan 95 % pro GC/ECD residue analysis	Chromservis
toluen pro HPLC-G 99,9 %	Chromservis
methyl nonadekanoát $\geq 98$ % (vnitřní standard C <sub>19,0</sub> )	Sigma Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> p.a. (pufr 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4)	Merck
kyselina octová p.a. 99 % (1M)	Penta
KOH p.a.	Lach:ner



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Vyhodnocení výsledků

Tab. 6 (str. 58,59) udává přehled jednotlivých faktorů prostředí na jednotlivých plochách pod jednotlivými druhy stromů. Lokality byly vybrány tak, aby se lišily svojí zrnitostí, přičemž lokalita Belchatów má nejmenší obsah písku (53 - 65 %) a lokalita Szczakowa má naopak obsah písku největší (76 - 86 %). Nicméně analýza variance ukazuje, že jednotlivé plochy tvoří statisticky homogenní skupiny, které by se lišily obsahem písku, naopak uvnitř ploch je značná variabilita a jednotlivé plochy na jedné lokalitě se statisticky významně neliší od ploch na jiné lokalitě. Podobné je to u jílu, který je do značné míry inverzní chování písku. Co se týče pH hodnoty, na lokalitě Piaseczno jsou vyšší (5,3 - 5,9) než na ostatních lokalitách (3,2 - 5,7), ale ani zde jednotlivé plochy tvoří statisticky homogenní skupiny.

Nejvyšší počet nejnižších průměrných hodnot se vyskytuje u dubu na lokalitě Szczakowa, a to pro procentuální obsah vápníku, draslíku, hořčíku, kationtovou výměnnou kapacitu a pro procentuální zastoupení písku. Minimální hodnoty pro C/N poměr, pH (KCl) a procentuální zastoupení jílu jsou u olše rovněž na lokalitě Szczakowa. Zde je současně nejvyšší hodnota pro procentuální zastoupení dusíku. Na této lokalitě je zároveň nejvyšší C/N poměr u borovice.

Nejvyšší počet nejvyšších naměřených hodnot se vyskytuje rovněž u dubu, a však na ploše Belchatów, kde jsou tyto hodnoty pro procentuální obsah uhlíku, draslíku a kationtovou výměnnou kapacitu. Dále se na lokalitě Belchatów vyskytují nejvyšší naměřené hodnoty pro dostupný fosfor a procentuální obsah vápníku pod olší. Nejnižší naměřené hodnoty pro procentuální zastoupení dusíku a současně uhlíku byly naměřeny pod břízou. Pod tímto stromem byla naměřena také nejvyšší hodnota procentuálního zastoupení jílu. Tato hodnota je totožná s hodnotou naměřenou u borovice na téže lokalitě, a proto obě hodnoty považují za nejvyšší. U borovice na lokalitě Belchatów byla současně naměřena nejnižší hodnota procentuálního zastoupení písku.

Na lokalitě Piaseczno se u dubu vyskytuje nejnižší průměrná hodnota pro dostupný fosfor a zároveň nejvyšší hodnota pro hořčík. Dále se zde vyskytuje nejvyšší naměřená hodnota pro pH (KCl), a to u břízy. Trend vykazuje lokalita Szczakowa, kde je 7 nejnižších naměřených hodnot z celkových 11. Naopak lokalita Belchatów vykazuje opačný jev, 6 z 11 naměřených hodnot byly nejvyšší. Lokalita Piaseczno neukazuje žádný výrazný trend. U stromů vykazuje největší trend dub, má 5 nejvyšších a současně i 5 nejnižších naměřených hodnot, a dále olše se 3 nejvyššími a současně 3 nejnižšími naměřenými hodnotami.

**Tab. 6:** Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé chemické vlastnosti na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Bełchatów pro obě vrstvy. Spodní řádky indikují F a p hodnoty jednofaktorové ANOVA, statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny. Hodnoty neoznačené písmeny tvoří statisticky homogenní skupiny (Tukey post hoc. test  $p < 0.05$ ). Chemické vlastnosti byly stanoveny polskými kolegy z University Life Sciences v Krakově.

Tab. 6

Lokalita	Dřevina	Hodnota	N %	C %	C/N	pH KCl	P dostupný (mg/100g)	Ca (me/100g)	K (me/100g)	Mg (me/100g)	CEC (me/100g)	písek (%)	jíl (%)
Piaseczno	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	0.093 ab	1.683 ab	18.22 c	5.353 bce	0.671 cde	6.223 de	0.157 e	0.557	10.076de	74.489 de	2.754 e
		SD	0.004	0.142	1.1247	0.577	0.249	1.220	0.013	0.009	0.748	2.674	0.389
	<i>Betula pendula</i>	průměr	0.091 abc	1.472 abc	16.23 cd	5.961 b	0.358 e	6.801 de	0.124	0.697	9.522 cde	73.538 de	2.732 e
		SD	0.014	0.263	0.51	0.307	0.131	2.254	0.017	0.183	2.102	7.485	1.024
	<i>Quercus robur</i>	průměr	0.084 abcd	1.174 abcd	17.17 cde	5.508 bce	0.196 e	5.314 de	0.194 e	0.774	8.703 de	69.332 de	2.955 e
		SD	0.036	0.385	4.5029	0.251	0.160	1.800	0.079	0.448	2.941	13.225	1.068
Szczakowa	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	0.038 de	0.870 de	31.81 de	3.677 cde	0.264 e	0.754 e	0.086 e	0.177	4.905 e	81.672 de	1.832 e
		SD	0.003	0.128	2.8683	0.221	0.163	0.316	0.016	0.075	0.501	3.533	0.301
	<i>Betula pendula</i>	průměr	0.045 bode	1.018 bode	24.11 cde	3.594 cde	0.696 cde	1.829 e	0.129 e	0.415	4.915 e	80.604 de	1.621 e
		SD	0.015	0.194	4.9818	0.344	0.401	1.152	0.024	0.291	1.555	10.328	0.922
	<i>Quercus robur</i>	průměr	0.033 de	0.697 de	26.08 e	3.848 cde	0.738 cde	0.452 e	0.076 e	0.152	3.545 e	86.551 d	2.453 e
		SD	0.003	0.116	3.0611	0.112	0.104	0.035	0.003	0.061	0.562	6.920	1.709
Belchatów	<i>Alnus glutinosa</i>	průměr	0.124 a	1.698 a	13.95 c	3.213 d	0.724 cde	1.078 e	0.097 e	0.352	8.219 de	76.421 de	1.405 e
		SD	0.013	0.168	0.3083	0.086	0.365	0.309	0.012	0.084	0.276	4.202	0.147
	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	0.049 cde	0.789 cde	21.10 de	3.678 cde	1.342 cd	4.335 de	0.159 e	0.328	8.798 de	53.804 e	10.287 d
		SD	0.002	0.159	3.566	0.189	0.365	0.144	0.036	0.084	0.191	4.1466	1.289
	<i>Betula pendula</i>	průměr	0.027 e	0.481 e	26.56 e	3.959 bode	0.393 de	3.864 de	0.153 e	0.492	7.824 de	57.084 e	10.28 d
		SD	0.010	0.102	8.6572	0.521	0.034	0.154	0.044	0.086	1.855	8.888	0.557
Belchatów	<i>Alnus glutinosa</i>	průměr	0.042 bode	1.155 bode	30.55 cde	5.772 bc	1.484 c	10.318 d	0.181 e	0.468	13.551 cd	65.302 de	7.654 d
		SD	0.013	0.125	8.4072	1.679	0.479	6.471	0.058	0.163	4.204	13.617	2.623
	<i>Quercus robur</i>	průměr	0.081 abc	2.401 abc	29.07 b	3.473 de	0.583 cde	5.758 de	0.334 d	0.467	16.121 c	56.333 e	7.458 d
		SD	0.009	0.203	2.127	0.137	0.120	0.601	0.029	0.058	0.717	1.579	0.294
		F	9.955	9.955	15.733	6.257	4.617	3.837	7.441	2.089	7.882	3.831	16.848
		p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.004	0.000	0.071	0.000	0.004	0.000

Složení mikrobiálního společenstva na základě PLFA popisuje Tab. 7. Největší houbová biomasa byla na ploše s olší na lokalitě Belchatów. Od ní se statisticky významně nelišily (ANOVA) borovice na lokalitě Szczakowa a bříza na lokalitě Piaseczno. Největší bakteriální biomasa byla pod dubem na lokalitě Piaseczno, všechny ostatní plochy vykazovaly statisticky významně menší hodnotu bakteriální biomasy a nelišily se mezi sebou (ANOVA).

Z Tab. 7 je patrné že nejvyšší průměrné hodnoty pro všechny charakteristické PLFA kromě hub, tedy pro bakterie, aktinobakterie, G+ i G- bakterie, jsou pod dubem na lokalitě Piaseczno. Toto také koresponduje s tím, že i celková mikrobiální biomasa má zde rovněž nejvyšší hodnotu.

Velice podobný je trend u nejnižších průměrných hodnot jednotlivých charakteristických PLFA, kdy pro všechny tyto PLFA kromě hub jsou nejnižší hodnoty u břízy na lokalitě Belchatów. Toto opět koresponduje s faktem, že i nejnižší naměřená hodnota pro celkovou mikrobiální biomasu je na téže lokalitě pod stejným stromem.

Nejvyšší průměrná hodnota pro houbové PLFA je u olše na Belchatówu, což koresponduje s faktem, že je zde současně i nejvyšší průměrná hodnota pro F/B poměr. Nejnižší průměrná hodnota pro houbové PLFA se nachází u borovice na Piasecznu. A nejnižší průměrná hodnota pro F/B poměr je u olše na Szczakowa.

Z této tabulky je zřejmé, že lokalita Belchatów, kde je nejvíce jílu a nejméně písku, nevyhovuje bakteriím, jejichž hodnoty jsou zde nejnižší, zatímco vyhovuje houbám, kde je tato hodnota nejvyšší a současně je nejvyšší i F/B poměr.

Naopak na lokalitě Piaseczno se nejlépe daří bakteriím, jejichž hodnoty jsou tu nejvyšší a nedaří se houbám, jejichž hodnota je zde druhá nejnižší a F/B poměr je rovněž nejnižší. Na lokalitě Szczakowa (nejvyšší zastoupení písku, nejnižší jílu) se pod olší vyskytuje nejnižší houbové PLFA ze všech lokalit.

**Tab. 7:** Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivá charakteristická PLFA ( $\mu\text{g}^{-1}$ ) na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Bełchatów pro vrstvu A. Spodní řádky indikují F a p hodnoty jednofaktorové ANOVA, statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny. Hodnoty neoznačené písmeny tvoří statisticky homogenní skupiny (Tukey post hoc. test  $p < 0.05$ ).

Lokalita	Dřevina	Hodnota	Houby	Bakterie	Aktino- bakterie	G+	G-	Celk. mikrob. biomasa	F/B poměr
Piaseczno	Pinus sylvestris	průměr	0.070b	9.366b	1.330b	2.641b	4.686b	11.356b	0.007b
		SD	0.006	2.506	0.339	0.421	1.694	2.838	0.001
	Betula pendula	průměr	0.224ab	9.251b	0.978b	2.492b	4.581b	11.478b	0.023b
		SD	0.088	1.752	0.185	0.582	0.923	2.152	0.007
	Quercus robur	průměr	0.267ab	19.549a	2.568a	5.074a	9.941a	23.124a	0.013b
		SD	0.083	4.189	0.649	1.588	1.620	5.104	0.004
Szczakowa	Pinus sylvestris	průměr	0.262ab	5.166b	0.570b	1.547b	2.279b	6.458b	0.045b
		SD	0.195	1.75	0.295	0.315	0.731	2.354	0.021
	Betula pendula	průměr	0.434ab	5.792b	0.466b	1.559b	2.677b	7.660b	0.069ab
		SD	0.238	1.830	0.106	0.253	0.930	2.534	0.016
	Quercus robur	průměr	0.153b	3.328b	0.260b	1.431b	1.223b	4.272b	0.042b
		SD	0.089	1.253	0.104	0.355	0.590	1.633	0.010
	Alnus glutinosa	průměr	0.052b	5.488b	0.588b	1.775b	2.752b	6.871b	0.009b
		SD	0.024	0.536	0.078	0.589	0.104	0.742	0.003
Bełchatów	Pinus sylvestris	průměr	0.260ab	4.138b	0.223b	1.238b	2.105b	5.906b	0.063ab
		SD	0.081	0.397	0.037	0.033	0.447	0.772	0.019
	Betula pendula	průměr	0.160b	2.275b	0.130b	0.675b	1.181b	3.276b	0.071ab
		SD	0.059	0.633	0.033	0.305	0.283	0.770	0.025
	Alnus glutinosa	průměr	0.629a	6.264b	0.465b	1.070b	3.823b	8.491b	0.118a
		SD	0.112	2.825	0.358	0.291	1.926	3.123	0.045
	Quercus robur	průměr	0.126b	5.288b	0.477b	1.743b	2.601b	7.064b	0.024b
		SD	0.068	0.482	0.190	0.415	0.124	0.323	0.013
		F	4.244	11.143	11.143	7.690	10.920	9.884	5.943
		p	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Složení mikrobiálního společenstva ve fermentační vrstvě (Oe) z pohledu zastoupení mikrobiálních společenstev ukazuje Tab. 8. Celková biomasa hub vykazuje velmi podobné chování v půdním substrátu pod břízami na všech třech lokalitách a tvoří statisticky homogenní skupinu, která se signifikantně liší od ostatních druhů (s výjimkou olše na lokalitě Szczakowa - zde je relativně vysoká vnitroskupinová variabilita). Podobně se liší i půdní substrát pod duby, která tvoří napříč lokalitami opět homogenní skupinu. Zemina pod duby vykazuje průměrně nejnížší množství biomasy hub. Avšak významné mezilokalitní rozdíly v abundanci houbové biomasy nejsou prokázány, tu spíše ovlivňuje rod dřeviny než lokalita.

V případě poměru abundancí biomas hub a bakterií (F/B) se dá konstatovat, že nejmenší hodnoty jsou jasně zaznamenány na lokalitě Piaseczno a Szczakowa, které tvoří v tomto smyslu homogenní skupinu, na lokalitě Bełchatów jsou hodnoty vyšší. Ukazuje se, že tento poměr je ovlivňován lokalitou, než dominantní dřevinou.

Vrstva Oe nevykazuje tak jasné trendy jako vrstva A. Nejcharakterističtější trend je u břízy na lokalitě Bełchatów, kde se vyskytují nejnížší průměrné hodnoty u všech bakteriálních PLFA (G+ a G-, aktinobakterie, bakterie). Nejnížší hodnota celkové mikrobiální biomasy se vyskytuje na téže posttěžební lokalitě u dubu. Nejnížší průměrná hodnota houbových PLFA je u borovice na lokalitě Piaseczno a je zde rovněž nejnížší hodnota F/B poměru.

U nejvyšších průměrných hodnot charakteristických PLFA je nejvýznamější olše na Bełchatówu, která má nejvyšší hodnotu houbových PLFA, současně nejvyšší hodnotu aktinobakterií, nejvyšší celkovou mikrobiální biomasu a rovněž nejvyšší F/B poměr. Nejvyšší hodnota G+ bakterií byla naměřena u břízy na lokalitě Piaseczno. Na téže lokalitě byla naměřena nejvyšší průměrná hodnota pro G- bakterie, a to u borovice. Na lokalitě Szczakowa byla naměřena jediná nejvyšší průměrná hodnota, a to bakteriální PLFA u břízy.

**Tab. 8:** Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivá charakteristická PLFA ( $\mu\text{g}^{-1}$ ) na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Bełchatów pro vrstvu Oe. Spodní řádky indikují F a p hodnoty jednofaktorové ANOVA, statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny. Hodnoty neoznačené písmeny tvoří statisticky homogenní skupiny (Tukey post hoc. test  $p < 0,05$ ).

Lokalita	Dřevina	Hodnota	Houby	Bakterie	Aktino-bakterie	G+	G-	Celk. mikrob. biomasa	F/B poměr
Piaseczno	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	4.538b	75.740	3.639	12.731	48.539	93.687	0.055b
		SD	2.946	11.491	0.241	2.507	6.918	17.220	0.027
	<i>Betula pendula</i>	průměr	10.702ab	76.459	5.026	13.610	43.41	102.145	0.130b
		SD	1.747	5.459	0.098	1.071	3.488	8.383	0.012
	<i>Quercus robur</i>	průměr	4.677b	71.464	4.795	12.228	43.879	90.691	0.063b
		SD	2.010	17.422	0.850	2.781	11.546	21.042	0.021
Szczakowa	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	12.274b	73.416	3.415	10.292	39.215	101.024	0.159b
		SD	6.509	12.793	1.118	2.371	5.1482	23.386	0.060
	<i>Betula pendula</i>	průměr	18.454ab	79.301	3.682	11.621	46.54	115.665	0.220b
		SD	8.304	22.935	0.816	3.683	13.578	34.774	0.064
	<i>Quercus robur</i>	průměr	11.221b	67.398	3.447	9.881	35.819	91.681	0.165b
		SD	1.966	3.926	0.564	0.964	2.827	6.340	0.021
Bełchatów	<i>Pinus sylvestris</i>	průměr	13.565ab	71.238	3.010	10.761	40.432	103.679	0.181b
		SD	5.975	12.006	0.484	1.354	5.9163	20.540	0.065
	<i>Betula pendula</i>	průměr	34.003a	74.482	2.529	9.630	42.285	127.403	0.463ab
		SD	5.062	9.284	0.944	2.190	4.9459	15.982	0.087
	<i>Alnus glutinosa</i>	průměr	24.416ab	53.437	1.895	6.272	26.298	92.183	0.447ab
		SD	7.687	10.336	0.182	0.426	3.9913	21.201	0.087
Belchatów	<i>Alnus glutinosa</i>	průměr	34.148a	66.506	8.251	7.551	38.971	136.298	0.735a
		SD	10.517	36.469	6.124	4.946	22.498	27.997	0.404
	<i>Quercus robur</i>	průměr	10.263b	62.681	3.546	10.612	36.137	90.196	0.161b
		SD	3.339	13.200	0.790	1.688	7.838	19.784	0.036
		F	6.109	0.370	1.378	1.317	0.730	1.076	4.630
		p	0.000	0.946	0.252	0.238	0.688	0.421	0.001

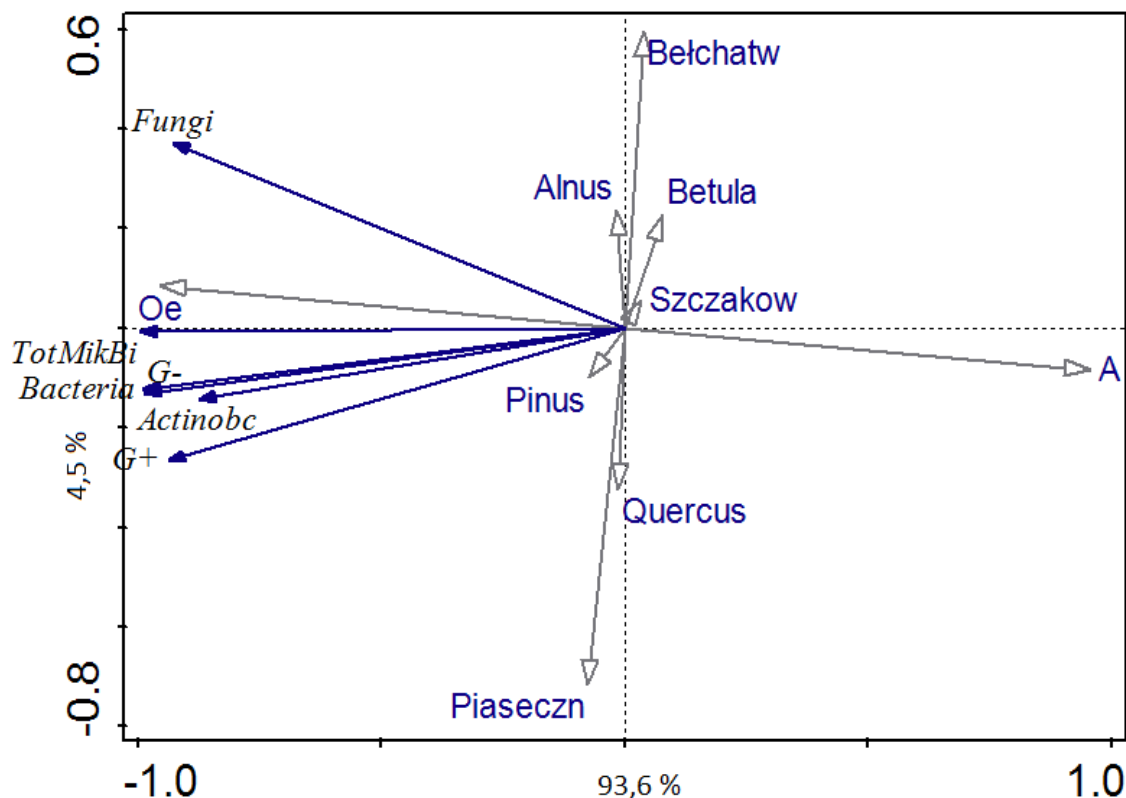
Z Tab. 9 je patrné, že ve vrstvě A poměr F/B negativně koreluje s procentuálním obsahem dusíku. F/B poměr pozitivně koreluje s C/N poměrem a dostupným fosforem. Dále je zde pozitivní korelace s jílem a negativní korelace s obsahem uhlíku. Ty jsou ovšem marginálně signifikantní. Ve vrstvě Oe je F/B poměr také pozitivně koreluje s dostupným fosforem. Dále signifikantně pozitivně koreluje F/B poměr s jílem. S procentuálním zastoupením dusíku je v negativní korelaci, ale jen marginálně signifikantní. S C/N poměrem koreluje také pozitivně jako ve vrstvě A (zde signifikantně), v této vrstvě (Oe) pouze marginálně signifikantně. Marginálně signifikantně reaguje také ve vztahu k písku, ovšem v negativní korelaci.

U celkové mikrobiální biomasy ve vrstvě A je pozitivně signifikantní korelace s hořečnatými ionty a pozitivně signifikantní je rovněž i korelace s pH (KCl). Pozitivně koreluje celková mikrobiální biomasa i s procentuálním zastoupením dusíku, avšak pouze marginálně signifikantně. A marginálně signifikantní, negativní korelaci má celková mikrobiální biomasa vůči C/N poměru. Ve vrstvě Oe je jen jedna signifikantní závislost, a to pozitivní korelace s dostupným fosforem. Souhrnně tedy lze říci, že dostupný fosfor velmi ovlivňuje F/B poměr a celkovou mikrobiální biomasu. Byl signifikantní ve třech ze čtyř případů.

**Tab. 9:** Tabulka korelačních koeficientů mezi chemickými vlastnostmi půdy a F/B poměrem a celkovou mikrobiální biomasou pro horizonty A a Oe z posttěžebních ploch Piaseczno, Belchatów a Szczakowa. Statisticky významné koeficienty jsou vyznačeny tučně.

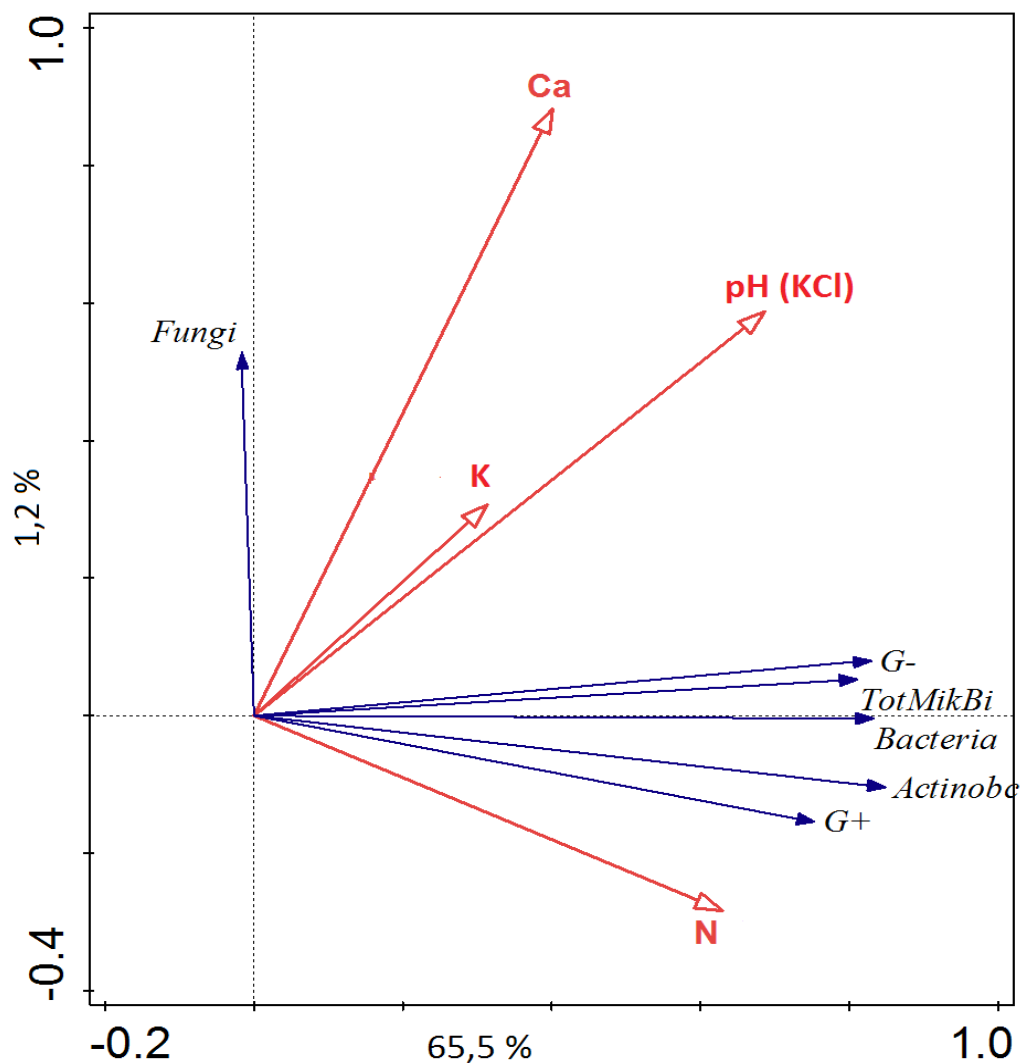
Chemické vlastnosti půdy	vrstva A		vrstva Oe	
	F/B poměr	Celková mikrobiální biomasa	F/B poměr	Celková mikrobiální biomasa
N %	<b>-0.739</b>	0.454	-0.508	-0.258
C %	-0.524	0.234	-0.376	-0.223
C/N	<b>0.635</b>	-0.476	0.444	0.168
pH KCl	0.042	<b>0.630</b>	0.073	0.108
P dostupný (mg/100g)	<b>0.619</b>	-0.343	<b>0.747</b>	<b>0.828</b>
Ca (me/100g)	0.293	0.356	0.442	0.356
K (me/100g)	-0.024	0.218	0.084	-0.099
Mg (me/100g)	-0.253	<b>0.759</b>	-0.156	-0.163
CEC (me/100g)	0.037	0.167	0.272	0.139
písek (%)	-0.243	0.047	-0.494	-0.199
jíl (%)	0.523	-0.323	<b>0.708</b>	0.307





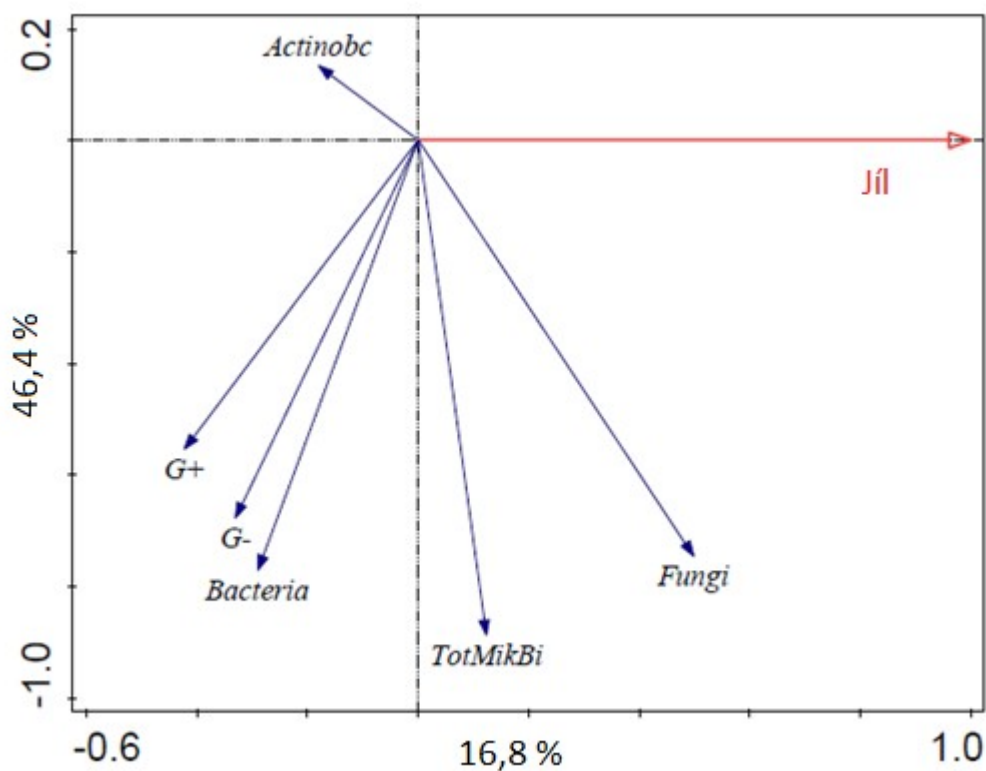
**Obr. 12:** PCA ordinační diagram pro koncentrace charakteristických PLFA na postřezebních lokalitách Piaseczno, Belchatów a Szczakowa, pod různými druhy dřevin (*Alnus*, *Betula*, *Pinus* a *Quercus*) ve vrstvách půdy A a Oe.

Z Obr. 12 je zřejmé, že 1. ordinační osa (horizontální) koresponduje s rozdílem mezi horizonty A a Oe, zatímco 2. ordinační osa (vertikální) koresponduje s rozdílem mezi plochami, zejména mezi plochami Belchatów a Piaseczno. První ordinační osa vysvětluje 93,6 % a druhá 4,5 % variability dat. Z Obr. 12 je patrné, že ve vrstvě Oe je mnohem vyšší zastoupení všech charakteristických PLFA než ve vrstvě A. Z Obr. 12 je dále patrné, že v mírně kyselých půdách na lokalitě Piaseczno se mikrobiální společenstva nejvíce blíží charakteristice mikrobiálních společenstev dubu a částěčně borovice (tedy dřevin, jejichž opad má vysoký C/N poměr). Tato společenstva mají větší podíl aktinobakterií a G+ bakterií. V silně kyselých půdách na lokalitě Belchatów se naopak mikrobiální společenstva celkově více podobají společenstvům charakteristickým pro břizu a olši s vyšším podílem hub.



**Obr. 13:** RDA ordinační diagram vlivu enviromentálních parametrů vybraných forward selection ( $p < 0.05$ , Monte Carlo permutation) koncentrace charakteristických PLFA na lokalitách Piaseczno, Belchatów a Szczakowa pod různými druhy dřevin (*Alnus*, *Betula*, *Pinus* a *Quercus*) ve vrstvě A.

Obr. 13 ukazuje, že ve vrstvě A se houbové PLFA chovají odlišně od všech ostatních PLFA. Houbové PLFA negativně korelují s procentuálním zastoupením dusíku v půdě. Naopak pozitivně korelují s pH (KCl), draslíkem a nejvíce pozitivně korelují s vápníkem a s draslíkem.



**Obr. 14:** RDA ordinační diagram vlivu enviromentálních parametrů vybraných forward selection ( $p < 0.05$ , Monte Carlo permutation) koncentrace charakteristických PLFA na lokalitách Piaseczno, Bełchatów a Szczakowa, pod různými druhy dřevin (*Alnus*, *Betula*, *Pinus* a *Quercus*) ve vrstvě Oe.

Na Obr. 14 vidíme, že 1. ordinační osa vysvětluje 16,8 % variability dat a 2. ordinační osa 46,4 % variability. Nejsilnější pozitivní korelace je u jílu s houbami. Ostatní PLFA jsou na jílu nezávislé, ale hlavní faktor, který určuje jejich chování, není z RDA patrný.

## 5.2 Diskuze

Hypotézy o vlivu dominantní dřeviny nebo zrnitosti substrátu se nepotvrdily. Ve vrstvě Oe je patrný jistý vliv dominantní dřeviny, i když ne zcela konzistentní u všech substrátů. Ve vrstvě A pak specifické kombinace substrátu a dřeviny vedou ke vzniku zcela specifických mikrobiálních společenstev. To se může zdát být v rozporu v porovnání s předchozími studiemi, např. [56], kde prezentované výsledky ukazují na spojitost mezi dominantní dřevinou a tím, jaké společenstvo se na dané lokalitě rozvinulo. Je však třeba si uvědomit, že předchozí studie na výsypkách byly prováděny zpravidla na jednom typu substrátu (např. [56,57,158]). Naopak v předkládané studii rostly sledované stromy na substrátech s velmi variabilní zrnitostí a pH. Dosažené výsledky také podporují ojedinělé studie, které sledovaly různé druhy stromů na substrátech různé zrnitosti a konstatují, že vliv zrnitosti je významnější než vliv pH. V této studii byla variabilní nejen zrnitost substrátu, ale i jeho pH. Navíc se zde vyskytují kombinace zrnitosti a pH, které nejsou v přírodě obvyklé. V přírodních půdách bývá zrnitost spojena s vyluhováním bazických kationtů a tím s pH, písčité půdy jsou tak zpravidla kyselější než půdy jílovité [28]. Naopak v této studii jsou půdy s nejvyšším obsahem jílu zároveň nejvyšší. Důvodem by mohlo být, že se jedná o výsypkové půdy, tudíž půdy s velkým vlivem minerálního substrátu, zejména obsahu pyritu a podobných minerálů, které pozměňují pH. Takto by bylo možné vysvětlit také hodnoty C/N poměru, které nejsou výrazně ovlivněny druhem dřeviny, ale opět zřejmě složením minerálního substrátu, který může být velmi variabilní [59].

Při rekultivaci výsypek po těžbě nerostných surovin hraje významnou roli rozvoj rostlinných společenstev na vytěženém substrátu [53]. Pro obnovu půd a přísun organické hmoty do půdy je ale především rozhodující rozvoj a složení mikrobiálních společenstev v půdě [61,135]. Právě rozvojem mikrobiálních společenstev a tím, jaký je rozhodující faktor určující kvantitu a kvalitu společenstva se zabývá moje diplomová práce.

Z výsledků vyplývá, že na složení mikrobiálních společenstev má zásadní vliv vertikální stratifikace půdy. Přestože takový rozdíl je očekávatelný, kvantifikací rozdílů mezi nadložním (O) a podložním (A) horizontem půdy na výsypkových půdách se dříve věnovalo jen minimum studií [46,57]. Je to relativně překvapivé zejména z důvodu, že Oe vrstva tvoří významnou součást půdního profilu a může se od A horizontu výrazně lišit.

Markantní odlišnost vrstvy A od vrstvy Oe (Obr. 12) je pravděpodobně způsobena velice nízkým obsahem uhlíku a živin ve vrstvě A. Podle [57] totiž obsah mikrobiální biomasy koreluje s obsahem organického uhlíku v půdě. Délka sukcese je navíc významným faktorem ovlivňujícím PLFA [10].

Podle [10] má půdní horizont zejména vliv na rozvoj bakteriálního společenstva. Houbové společenstvo je podle něj více ovlivněno sezónností. Zkoumané výsypky byly rekultivovány před cca 25 lety. To je relativně krátká doba pro to, aby ve vrstvě A byl více zastoupen organický uhlík. Půdní mikrobiální společenstva jsou proto vyvinuta pouze ve vrstvě Oe, jak je patrné i z hodnot v Tabulce 7 a 8. Obr. 13 ukazuje pozitivní korelaci jak mezi houbovými PLFA a pH, tak mezi bakteriálními PLFA a pH. pH je podle [10] významným faktorem ovlivňujícím složení mikrobiálního společenstva. Se snižujícím se pH se zvyšuje podíl hub na mikrobiálním společenstvu a naopak vyšší pH prospívá bakteriím.

Dalo by se tedy říci, že univerzální pravidla u jednotlivých druhů dominantních dřevin, vyvinutých na určité rekultivované ploše, se nedají automaticky aplikovat na jiné půdní substráty narozdíl od běžných přirozených půd, kde jsou jednotlivé abiotické vlastnosti substrátů omezeny jen na některé kombinace a dominantní dřeviny se na těchto přirozeně se vyskytujících substrátech chovají podobně, a tak jsou složení půd a jim odpovídajících mikrobiálních společenstev snázeji predikovatelná.

## **ZÁVĚR**

Z porovnání rozvoje a složení mikrobiálních společenstev na třech odlišných výsypkách pod různými dominantními druhy dřevin vyplývá, že ani dřevina ani zrnitostní složení nemá vliv na složení mikrobiálního společenstva.

Vysvětlením, že na lokalitách nejsou vytvořena specifická společenstva pro jednotlivé dominantní druhy dřevin je, že porekultivační doba je příliš krátká a mikrobiální společenstva se ještě nespecifikovala.

Z analýzy PLFA vyplývá, že zásadní vliv na rozvoj společenstev má vertikální rozvrstvení horizontu. Toto je vysvětleno zejména pravděpodobně nízkým obsahem uhlíku a živin v nepříliš vyvinuté vrstvě A.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintrifosfát
CF	Oxidovatelný uhlík extrahovaný z fumigovaných vzorků
CFE	Chloroformová fumigační extrakce
CNF	Oxidovatelný uhlík extrahovaný z nefumigovaných vzorků
C/N poměr	Poměr uhlíku a dusíku
F/B poměr	Poměr hub a bakterií
FAME	Phospholipid Acids Methylesters
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
GC/ECD	Plynová chromatografie využívající detektor s elektronovým záchytem
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kec	Kompenzační faktor
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PLFA	Phospholipid Fatty Acids
RDA	Redundanční analýza
rDNA, DNA	(ribozomální) deoxyribonukleová kyselina
CLSM	Konfokální laserová rastrovací mikroskopie
SIR	Substrátem indukovaná respirace
SMB	Soil Microbial Biomass
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SSU rRNA	Ribonukleová kyselina z malé ribozomální podjednotky
UV	Ultrafialové záření

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Hlíзка na kořenech olše obsahující aktinobakterie rodu <i>Frankia</i> .....	18
Obr. 2: Lesnická rekultivace - borová monokultura .....	34
Obr. 3: Rozdělení organické hmoty v půdě .....	38
Obr. 4: Základní diagnostické horizonty .....	41
Obr. 5: Dělení fosfolipidových mastných kyselin .....	44
Obr. 6: Indukce změn ve struktuře PLFA různými stresovými faktory .....	45
Obr. 7: Palmitolejová kyselina, PLFA biomarker pro Gram-negativní bakterie .....	46
Obr. 8: Tuberkulostearová kyselina, PLFA biomarker pro aktinobakterie .....	46
Obr. 9: Kyselina linolová, PLFA biomarker pro houby .....	46
Obr. 10: Odběrová místa .....	53
Obr. 11: Pískovna Piaseczno .....	53
Obr. 12: PCA ordinační diagram pro koncentrace charakteristických PLFA na posttěžebních lokalitách Piaseczno, Belchatów a Szczakowa, pod různými druhy dřevin ( <i>Alnus</i> , <i>Betula</i> , <i>Pinus</i> a <i>Quercus</i> ) ve vrstvách půdy A a Oe .....	65
Obr. 13: RDA ordinační diagram vlivu enviromentálních parametrů vybraných forward selection ( $p < 0.05$ , Monte Carlo permutation) koncentrace charakteristických PLFA na lokalitách Piaseczno, Belchatów a Szczakowa pod různými druhy dřevin ( <i>Alnus</i> , <i>Betula</i> , <i>Pinus</i> a <i>Quercus</i> ) ve vrstvě A .....	66
Obr. 14: RDA ordinační diagram vlivu enviromentálních parametrů vybraných forward selection ( $p < 0.05$ , Monte Carlo permutation) koncentrace charakteristických PLFA na lokalitách Piaseczno, Belchatów a Szczakowa, pod různými druhy dřevin ( <i>Alnus</i> , <i>Betula</i> , <i>Pinus</i> a <i>Quercus</i> ) ve vrstvě Oe .....	67

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled nejdůležitějších významů a funkcí půdních mikroorganismů .....	21
Tab. 2: Biomarkery významných skupin půdních organismů .....	47
Tab. 3: Souřadnice odběrových míst .....	53
Tab. 4: Teplotní program použitý při analýze PLFA .....	56
Tab. 5: Použité chemikálie .....	56
Tab. 6: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé chemické vlastnosti na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Belchatów pro obě vrstvy .....	58
Tab. 7: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé charakteristické PLFA ( $\mu\text{g}^{-1}$ ) na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Belchatów pro vrstvu A .....	61
Tab. 8: Tabulka průměrných hodnot a směrodatných odchylek pro jednotlivé charakteristické PLFA ( $\mu\text{g}^{-1}$ ) na posttěžebních plochách Piaseczno, Szczakowa a Belchatów pro vrstvu Oe .....	63
Tab. 9: Tabulka korelačních koeficientů mezi chemickými vlastnostmi půdy a F/B poměrem a celkovou mikrobiální biomasou pro horizonty A a Oe z posttěžebních ploch Piaseczno, Belchatów a Szczakowa .....	64



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Abdul-Kareem, A. W.; McRae, S. G. The effects on topsoil of long-term storage in stockpiles. *Plant and Soil* **1984**, 76, 357–363.
- [2] Aerts R. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* **1997**, 79, 439–449.
- [3] Aerts, R., de Caluwe, H. Nutritional and plant-mediated controls on leaf litter decomposition of *Carex* species. *Ecology* **1997**, 78, 244–260.
- [4] Akala, V. A.; Lal, R. Soil Organic Carbon Sequestration in Reclaimed Minesoils, 2001. National energy technology laboratory. [http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/01/carbon\\_seq/5c4.pdf](http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/01/carbon_seq/5c4.pdf) (accessed March 13, 2016).
- [5] Allison, S. D.; Gartner, T. B.; Mack, M. C.; McGuire, K. and Treseder, K. Nitrogen alters carbon dynamics during early succession in boreal forest. *Soil Biol. Biochem* **2010**, 42, 1157–1164.
- [6] Anderson J. D.; Ingram L. J.; Stahl P. D. Influence of reclamation management practices on microbial biomass carbon and soil organic carbon accumulation in semiarid mined lands of Wyoming, *Applied soil ecology* **2008**, 40, 387–397.
- [7] Anderson, J. P. E. and Domsch, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **1978**, 10, 215–221.
- [8] Bailey V. L.; Peacock A. D.; Smith J. L.; Bolton H. Jr. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **2002**, 1385.
- [9] Baldrian, P.; Trögl, J.; Frouz, J.; Šnajdr, J.; Valášková, V.; Merhautová, V.; Cajthaml, T.; Herinková, J. Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining. *Soil Biology & Biochemistry* **2008**, 40, 2109–2110.
- [10] Baldrian, P.; Trögl, J.; Frouz, J.; Šnajdr, J.; Valášková, V.; Merhautová, V.; Cajthaml, T.; Herinková, J. Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining. *Soil Biology and Biochemistry* **2008**, 40, 2107–2115.
- [11] Baldrian, P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environ* **2009**, 55, 370–378.
- [12] Baldrian, P.; Voříšková, J.; Dobiášová, P.; Merhautová, V.; L. Lisá, and V. Valášková. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* **2011**, 338, 111–125.
- [13] Bardgett R. The biology of soil, A community and ecosystem approach, *Oxford university press* **2005**, 22–23.
- [14] Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*, 4th ed.; Blackwell Publishing: Oxford, 2006.
- [15] Bejček V. *Sukcese a produktivita drobných savců na výsypkách v Mostecké pánvi*. Academia: Praha, 1983.

- [16] Berg, B. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management* **2000**, 133, 13-22.
- [17] Berlemont, R. and Martiny, A. C. Phylogenetic Distribution of Potential Cellulases in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2013**, 79, 1545-1554.
- [18] Bernier, N. Earthworm feeding activity and development of the humus profile. *Biology and Fertility of Soils* **1998**, 26, 215–223.
- [19] Biologická fixace dusíku. [https://cs.wikipedia.org/wiki/Biologick%C3%A1\\_fixace\\_dus%C3%ADku](https://cs.wikipedia.org/wiki/Biologick%C3%A1_fixace_dus%C3%ADku) (accessed Feb 17, 2016).
- [20] Bollmann, A. *Nitrification in Soil*. In J. Bloem, D. W. Hopkins, and A. Benedetti, eds. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, 2006, 136–141.
- [21] Bonan, G. B.; Shugart, H. H. Environmental factors and ecological processes in boreal forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1989**, 20, 1-28.
- [22] Bonkowski, M.; Cheng, W.; Griffiths, B. S.; Alphei, J.; Scheu, S. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology* **2000**, 36, 135-147.
- [23] Bossio, D. A.; Scow, K. M.; Gunapala, N.; Graham, K. J. Determinant of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microbial Ecology* **1998**, 1-10.
- [24] Bot A.; Benites J. The importance of soil organic matter, 2005. Natural Resources Management and Environment Department. <http://www.fao.org/docrep/009/a0100e/a0100e00.HTM> (accessed April 10, 2016).
- [25] Bottomley, P. J. and Myrold, D. D. Biological N Inputs. In E. A. Paul, ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier Academic Press **2007**, 365-387.
- [26] Bradshaw, A. Restoration of mined lands using natural processes. *Ecological Engineering* **1997**, 8, 255–269.
- [27] Bradshaw A. The use of natural processes in reclamation advantages and difficulties, *Landscape and Urban Planning* **2000**, 51 (2-4): 89-100.
- [28] Brady, N. C.; Weil, R. R. *The Nature and Properties of Soils*, Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, **2008**, 975.
- [29] Bressan, M. et al., 2008. Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental microbiology* **2008**, 10 (8), 2184-2187.
- [30] Brookes, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, **1995**, 19 (4), 269-279.
- [31] Calvaruso, C.; N'Dira, V.; Turpault, M.-P. Impact of common European tree species and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) on the physicochemical properties of the rhizosphere. *Plant soil* **2011**, 342, 469-480.
- [32] Carter, M. R. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions, *Agron Journal* **2002**, 94, 38-47.

- [33] Casselman, C. N.; Fox, T. R.; Burger, J. A.; Jones, A. T.; Galbraith, J. M. Effects of silvicultural treatments on survival and growth of trees planted on reclaimed mine lands in the Appalachians. *Forest Ecology and Management* **2006**, 223, 403-414.
- [34] Cornejo, F. H.; Verela, A.; WrightSource, J. Tropical Forest Litter Decomposition under Seasonal Drought: Nutrient Release, Fungi and Bacteria. *Oikos* **1994**, 70, 183-190.
- [35] Cortez, J.; E. Garnier, A.; Perez-Harguindeguy, M.; Debussche and D. Gillon. Plant traits, litter quality and decomposition in a Mediterranean old-field succession. *Plant Soil* **2007**, 296, 19–34.
- [36] Coûteaux, M.; Bottner, P.; Berg, B. Litter decomposition, climate and litterQuality. *Trends in Ecology and Evolution* **1995**, 10, 63-66.
- [37] Diagnostický půdní horizont. USDA.  
<http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/profile.jpg> (accessed Feb 15, 2016).
- [38] Dimitrovský, K. *Lesnická rekultivace devastovaných půd báňskou činností*. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha, 1979.
- [39] Drenovsky, R. E.; Elliott, G. N.; Graham, K. J.; Scow, K. M. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* **2004**, 1973-1799.
- [40] Dumas-Gaudot, E. et al. Modulation of Host Defence Systems. In Y. Kapulnik and D. D. Douds, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht: Springer Netherlands **2000**, 173–200.
- [41] Elbl, J., Kintl, A.; Plošek, L. Neviditelný život v půdě, 2014, Příroda. Cz Internetové stránky <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=2623> (accessed Feb 10, 2015).
- [42] Eriksson, K-E. L.; Blanchette, R. A.; Ander, P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer: Berlin Heidelberg New York, **1990**, 407.
- [43] Federici, E.; Giubilei, M. A.; Cajthaml, T.; Petruccioli, M.; Annibale, A. D. Lentinus (Panus) tigrinus augmentativ of a historically contaminated soil: Matrix decontamination and structure and fiction of the resident bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 1264-1268.
- [44] Fettweis, U.; Bens, O.; Hüttl, R. F. Accumulation and properties of soil organic carbon at reclaimed sites in the Lusatian lignite mining district afforested with Pinus sp., *Geoderma* **2005**, 129 (1-2), 81-91.
- [45] Fierer, N.; Nemergut, D.; Knight R.; Craine, J. M. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* **2010**, 161, 635-642.
- [46] Fierer, N.; Schimel, J. P.; Holden, P. A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* **2003**, 35, 167-176.
- [47] Finkenbein, P.; Kretschmer, K.; Kuka, K.; Klotz, S. and Heilmeyer, H. Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump: *Soil Biology and Biochemistry* **2013**, 56, 87-89.
- [48] Fontaine, S.; Mariotti, A.; Abbadie, L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition. *Soil Biology and Biochemistry* **2003**, 35, 837-843.

- [49] Formy nadložního humusu, Elektronický taxonomický klasifikační systém půd. Pedologie. <http://klasifikace.pedologie.cz/index.php?action=showFormyNadloznihoHumusu> (accessed March 16, 2016).
- [50] Frostegard, A.; Baath, E.; Tunlid, A. Shifts in the Structure of Soil Microbial Communities in Limed Forests as Revealed by Phospholipid Fatty Acid Analysis. *Soil Biol. Biochemistry* **1993**, 723-725.
- [51] Frostegard, A.; Baath, E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fertil Soils* **1996**, 59-63.
- [52] Frouz, J. Návrat přírody do krajiny poznamenané těžbou, Sokolovská uhelná a.s., Sokolov, **1999**, 16.
- [53] Frouz, J.; Keplin, B.; Pižl, V.; Tajovský, K.; Starý, J.; Lukešová, A.; Nováková, A.; Balík, V.; Háněl, L.; Materna, J.; Düker, C.; Chalupský, J.; Rusek, J.; Heinkele, T. Soil biota and upper soil layers development in two contrasting postmining chronosequences. *Ecol.Eng.***2001**,17,275-284.
- [54] Frouz, J. *The effect of soil macrofauna on litter decomposition and soil organic matter accumulation during soil formation in spoil heaps after brown coal mining*. Ekologia Bratislava, 21, No. 4, 2002
- [55] Frouz, J.; Křišťůfek V.; Bastl J.; Kalčík J. a Vaňková H. Determination of toxicity of spoil substrates after brown coal mining using a laboratory reproduction test *Enchytraeus crypticus* (oligochaeta). *Water, Air, and Soil Pollution* **2005**, 162, 37-47.
- [56] Frouz, J.; Livečková, M.; Albrechtová, J.; Chroňáková, A.; Cajthaml, T.; Pižl, V.; Háněl, L.; Starý, J.; Baldrian, P.; Lhotáková, Z.; Šimáčková, H.; Cepáková, Š. Is the effect of trees on soil properties mediated by soil fauna? A case study from post-mining sites. *Forest Ecology and Management* **2013**, 309, 87-95.
- [57] Frouz, J., Nováková, A. Development of soil microbial properties in topsoil layer during spontaneous succession in heaps after brown coal mining in relation to humus microstructure development. *Geoderma* **2005**, 129, 54-64.
- [58] Frouz, J., Popperl, J., Přikryl, I., Štrudl, Tvorba nové krajiny na Sokolovsku, Sokolovská uhelná, právní nástupce a.s., Sokolov, 2007, 26.
- [59] Frouz, J. *Soil Biota and Ecosystem Development in Post Mining Sites*; CRC Press, 2013, 316.
- [60] Frouz, J. *Soil biota development in areas affected by open coast coal mining in Europe and its role in soil formation in Fosdyke B.G.* (ed.) Coal Mining: Research, Technology and Safety. Nova Publishers, New York, 2008.
- [61] Frouz, J.; Prach, K.; Pižl, V.; Háněl, L.; Starý, J.; Tajovský, K.; Materna, J.; Balík, V.; Kalčík, J.; Řehounková, K. Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *European journal of soil biology* **2008**, 44, 109-121.
- [62] Frouz, J.; Pižl, V.; Cienciala, E.; Kalčík, J. Carbon storage in post-mining forest soil, the role of tree biomass and soil bioturbation. *Biogeochemistry* **2009**, 94, 111-121.
- [63] Frouz, J. Půda – živý systém. Interakce půdní fauny a mikroflóry a jejich význam pro přeměny organické hmoty v půdě. *Vesmír* **2010**, 89, 490.

- [64] Frouz, J. Rozvoj půd jako základní předpoklad obnovy ekosystémových služeb na těžce disturbovaných plochách, *Acta Environmentalica Universitas Comeniane* (Bratislava). *Supplement* **2011a**, 19, 66-70.
- [65] Frouz, J. Rekultivace levněji a lépe. *Ekologie a společnost* **2011b**, 6(11), 11-15.
- [66] Ganjegunte, G. K.; Wick, A. F.; Stahl, P. D.; Vance, G. F. Accumulation and composition of total organic carbon in reclaimed coal mine lands. *Land Degradation and Development* **2009**, 20, 156-175.
- [67] Gianinazzi, S. et al. . *Contribution of Arbuscular Mycorrhiza to Soil Quality and Terrestrial Ecotoxicology*. In J. Bloem, D. W. Hopkins, and A. Benedetti, eds. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, **2006**, 248–256.
- [68] Giri, B. et al. *2 Microbial Diversity in Soils Origin of Microbial Diversity. In Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer, 2005, 19-55.
- [69] Gremlíková, T.; Vrabec, V.; Čílek, V.; Zavadil, V.; Lepšová, A.; Volf, O. *Industriální krajina a její přirozená obnova*. Novela bohemia, Praha, 2013, 109.
- [70] Gryndler, M.: Mykologie, 2013, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem Přírodovědecká fakulta Ústí nad Labem. [http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory\\_2014/Opora\\_Mykologie.pdf](http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory_2014/Opora_Mykologie.pdf) (accessed July 5, 2016).
- [71] Hartmann, A. et al., 2006. *Nodulating Symbiotic Bacteria and Soil Quality*. In J. Bloem, D. W. Hopkins, and A. Benedetti, eds. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, 2006, 231–247.
- [72] Hättenschwiler, S.; Gasser, P. Soil animals alter plant litter diversity effects on decomposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **2000**, 120, 1519-1524.
- [73] Helingerová, M.; Frouz, J. and Šantrůčková, H. Microbial activity in reclaimed and unreclaimed post-mining sites near Sokolov (Czech Republic). *Ecol. Eng.* **2010**, 36, 768-776.
- [74] Hendrix, P. J.; Parmelee, R. W.; Crossley, D. A.; Coleman, D. C., Odum, E. P. and Goffman, P. M. Detritus food webs in conventional and no-tillage agrosystems. *Bioscience* **1986**, 36, 374-380.
- [75] Hessen, D. O.; Agren, G. I.; Anderson, T. R.; Elser, J. J.; De Ruiter, P. C. Carbon sequestration in ecosystems: the role of stoichiometry, *Ecology* **2004**, 85, 1179-1192.
- [76] Hill, G. T.; Mitkowski N. A.; Aldrich-Wolfe, L.; Emele, L. R.; Jurkonie, D. D.; Ficke, A.; Maldonado-Ramirez, S.; Lynch, S. T.; Nelson, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* **2000**, 25-28.
- [77] Honzík, R.; Slejška, A. Fosfolipidové mastné kyseliny (PLFA) jako indikátory změn mikrobiálních půdních složek. *Biom.cz* 2006 <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/fosfolipidove-mastne-kyseliny-plfa-jako-indikatory-zmen-mikrobiálních-pudnich-slozek> (accessed June 12, 2016).
- [78] Horwath, W. Carbon Cycling and Formation of Soil Organic Matter. In E. A. Paul, ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier Academic Press **2007**, 303-339.
- [79] Chan, K.Y., Using earthworms to incorporate lime into subsoil to ameliorate acidity, *Communications in soil science and plant analysis* **2003**, 34, 985-997.

- [80] Chatterjee, A.; Lal, R.; Shrestha, R. K.; Ussiri, D. A. N.; Soil carbon pools of reclaimed minesoils under grass and forest landuses, *Land Degradation and Development* **2009**, *20*, 300-307.
- [81] Chen, R.; Senbayram, M.; Blagodatsky, S.; Myachina, O.; Dittert, K.; Lin, X.; Blagodatskaya, E.; Kuzyakov, Y. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology* **2014**, *20*, 2356-2367.
- [82] Cheng, W.; Coleman, D. C. Effect of living roots on soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **1990**, *22*, 781-787.
- [83] Cherepnev, G. V.; Abreimova, Y. V., Yakovleva, G. Y. and Kurinenko, B. M. The morphological and physiological differences between fast- and slow-growing *Escherichia coli* cells. *Microbiology* **2003**, *72*, 238-239.
- [84] Chew, L.; Obbard, J.P. and Stanford, J.P. Microbial cellulose decomposition from rifle range contaminated by heavy metals. *Environ. Poll.* **2001**, *111*, 367-375.
- [85] Chodak, M.; Niklińska, M. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. *Applied Soil Ecology* **2010**, *46*, 268-275.
- [86] Chodak, M.; Niklińska M. The effect of different tree species on the chemical and microbial properties of reclaimed mine soils. *Biol fertil soils* **2010**, *46*, 555-556.
- [87] Chowdhury, T. R.; Dick, R. P. Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **2012**, 285-291.
- [88] Iannelli, R.; Bianchi, V.; Macci, C.; Peruzzi, E.; Chiellini, C.; Petroni, G. and Masciandaro, G. Assessment of pollution impact on biological activity and structure of seabed bacterial communities in the Port of Livorno (Italy). *Science of the Total Environment* **2012**, *426*, 56-64.
- [89] Ibekwe, A.; Kennedy, A. C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions FEMS *Microbiol. Exil.* **1998**, *26*, 151-163.
- [90] Ingham, R. E.; Trofymow, J. A.; Ingham, E. R.; Coleman, D. C. Interactions of Bacteria, Fungi and their Nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth, *Ecological Monographs* **1985**, *55*(1), 119-140.
- [91] Ingram, L. J.; Schuman, G. E.; Stahl, P. D.; Spackman, L. K. Microbial respiration and organic carbon indicate nutrient cycling recovery in reclaimed soils. *Soil Science Society of America Journal* **2005**, *69*, 1737-1745.
- [92] Jacinthe, P. A.; Lal, R.; Ebinger, M. 2003: Land-use options for carbon sequestration in reclaimed mined lands, National energy technology laboratory, dostupné online: <http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/03/carbon-seq/PDFs/105.pdf> (accessed April 12, 2016).
- [93] Jochimsen, M. E. A. Reclamation of colliery mine spoil founded on natural succession. *Water, Air, and Soil Pollution* **1996**, *91*, 99-108.
- [94] Jonáš, F. *Určení způsobů rekultivace a tvorba nových půd na výsypkách v severočeském hněduhelném revíru*. Výzkumný ústav meliorací, Praha- Zbraslav nad Vltavou, 1975, 49-109.
- [95] Jørgensen, S. E.; Fath, B. D. et al. *Encyclopedia of Ecology*, 1. ed., Elsevier B. V., Amsterdam, 2008, 3834.

- [96] Jouquet, P.; Dauber, J.; Lagerlof, J.; Lavelle, P.; Lepage, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology* **2006**, 32 (2), 153-164.
- [97] Kabrna, M. Studies of land restoration on spoil heaps from brown coal mining in the Czech Republic – a literature review. *Journal of Landscape Studies* **2011**, 4, 59-69.
- [98] Kaiser, E. A.; Mueller, T.; Joergensen, R. G.; Insam, H. and Heinemeyer, O. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **1992**, 24, 675-683.
- [99] Kaur A.; Chaudhary A.; Kaur A.; Choudhary R.; Kaushik R. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, **2005**, 1103-1110.
- [100] Knorr, M.; Frey, S. D.; Curtis, P. S. Nitrogen additions and litter decomposition a metaanalysis. *Ecology* **2005**, 86, 3252-3257.
- [101] Kodíček, M.; Karpetko, V. *Biofyzikální chemie*. ACADEMIA, 2000, 203-204.
- [102] Krsek, M. *Metody studia diverzity půdních mikrobiálních společenstev*. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Ústav experimentální biologie [http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob\\_spol/web/media/pudnimikrobialni-spolecenstva-skripta.pdf](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob_spol/web/media/pudnimikrobialni-spolecenstva-skripta.pdf) (accessed March 13, 2015)
- [103] Kuráň, P.; Trögl, J.; Nováková, J.; Pilařová, V.; Dáňová, P.; Pavlorková, J.; Kozler, J.; Novák, F.; Popelka, J. *Biodegradation of spilled diesel fuel in agricultural soil: Effect of humates, zeolite and bioaugmentation*. Sci. World J. Volume **2014**.
- [104] Kuznetsova, T.; Rosenvald, K.; Ostonen, I.; Helmisaari, H.- S.; Mandre, M.; Lohmus, K.; Survival of black alder (*Alnus glutinosa* L.), silver birch (*Betula pendula* Roth.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in a reclaimed oil shale mining area. *Ecological engineering* **2010**, 36, 495-502.
- [105] Lavelle, P.; Spain, A. V. *Soil ecology*, Springer, Dordrecht, 2005, 654.
- [106] Ledvina, R.; Horáček, J. *Agrotechnické požadavky na zemědělské stroje – (část půdoznalství)*, Jihočeská univerzita - zemědělská fakulta, České Budějovice, 1997, 145.
- [107] Lepšová, A. *Vliv acidifikace a melioračních opatření na ektomikorhizní systém lesních dřevin, především smrku ztepilého*. Hruška J. a E. Cienciala (eds.) *Dlouhodobá acidifikace a nutriční degradace lesních půd – limitující faktor současného lesnictví*. Ministerstvo životního prostředí ČR, Praha, 2002, 128-138.
- [108] Leyval, C.; Turnau, K. and Haselwandter, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **1997**, 7, 139–153.
- [109] Li, W.J.; Li, J.H.; Lu, J.F.; Zhang, R.Y. and Wang, G. Legume-grass species influence plant productivity and soil nitrogen during grassland succession in the eastern Tibet Plateau. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, 44, 164-169.
- [110] Lin, Y.; King, J. Y. Effects of UV Exposure and Litter Position on Decomposition in a California Grassland. *Ecosystems* **2014**, 17, 158-168.

- [111] Maciaszek, W.; Gruba, P.; Lasota, J.; Wanic, T.; Zwydak, M. Physicochemical properties of soils under natural stands and spruce monocultures in Beskid Zachodni. *Sylvan* **2009**, *153*, 336-343.
- [112] McGuire, A. D.; Anderson, L. G.; Christensen, T. R.; Dallimore, S.; Guo, L.; Hayes, D. J.; Sensitivity of the carbon cycle in the Arctic to climate change. *Ecological Monography* **2009**, *79*, 523-555.
- [113] McKee, T.; McKee, J. R. Biochemistry – An Introduction. WCB, **1996**, 259-284.
- [114] Moore – Kucera, J.; Dick, R. P. PLFA Profiling of Microbial Community Structure and Seasonal Shifts in Soils of a Douglas-fir Chronosequence. *Microb Ecol* **2008**, 501-503.
- [115] Moreno-de las Heras, M.; Merino-Martin, L.; Nicolau, J.M. Effect of vegetation cover on the hydrology of reclaimed mining soils under Mediterranean-Continental climate, *Catena* **77** **2009**, 39-47.
- [116] Nešporová, M. *Validace a optimalizace postupu odběrů, transportu a úpravy vzorků půd pro mikrobiální analýzy*, Diplomová práce, Př. F. Masarykova univerzita Brno, **2008**, 80 pp.
- [117] Němeček, J.; Smolíková, L.; Kutílek M. Pedologie a paleopedologie, Academia, Praha, 1990, 546.
- [118] Olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), Zahradnictví Franc, [www.shop.zahrady-rostliny.cz](http://www.shop.zahrady-rostliny.cz) (accessed June 15, 2016).
- [119] Palojarvi, A. Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. From: Microbiological Methods For Assessing Soil Duality, Bloem J, Hopkána DV, Benedetti A (eds) CABI Publishing, CAB International 2006, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK, **2006**, 204-211.
- [120] Papadopoulou, E. S.; Karpouzas, D. G.; Menkissouglu-Spiroudi, U. Extraction Parameters Significantly Influence the Quantity and the Profile of PLFAs Extracted from Soils. *Microb Ecol* **2011**, 1-4.
- [121] Paschke, M.; Redente, E.; Brown, S. Biology and establishment of mountain shrubs on mining disturbances in the Rocky Mountains, USA. *Land degradation and development* **2003**, *14*, 459-480.
- [122] Paul, N. D.; Jones, D. Ecological role of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution* **2003**, *18*, 48-55.
- [123] Pensa, M.; Karu, H.; Luud, A., Rull, E.; Vaht, R. The effect of planted trees species on the development of herbaceous vegetation in a reclaimed opencast. *Can. J. For. Res.* **2008**, *38*, 2674-2686.
- [124] Phospholipid-derived fatty acids. Wikipedia.org. 2010. [https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid-derived\\_fatty\\_acids](https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid-derived_fatty_acids) (accessed March 2, 2016).
- [125] Pietrzykowski, M.; Socha, J. An estimation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) ecosystem productivity on reclaimed post-mining sites in Poland (central Europe) using of allometric equations. *Ecological Engineering* **2011**, *37*, 381-386.
- [126] Piha, M. I.; Vallack, H. W.; Refler, B. M.; Michael, N.; Reeler, B. M. A low input approach to vegetation establishment on mine and coal ash wastes in semi-arid regions: II. Lagooned pulverized fuel ash in Zimbabwe. *Journal of Applied Ecology* **1995**, *32*, 382-390.



- [127] Piotrowska-Seget, Z.; Mrozik, A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies* **2003**, 669-675.
- [128] Plante, A.F. Soil Biogeochemical Cycling of Inorganic Nutrients and Metals. In E. A. Paul, ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier Academic Press* **2007**, 389-432.
- [129] Plichta, W.; Gurtowski, M. A general analytical model of the process of humus mineralization and accumulation in soil. *Ecological Modelling* **1989**, 44 (3-4), 209-217.
- [130] Pointing, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 57(1-2), 20–33.
- [131] Ponder, F. Jr.; Tadros, M. *Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. Applied Soil Ecology* **2002**, 19, 173–182
- [132] Ponge, J. F. Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. *Soil Biology and Biochemistry* **2003**, 35(7), 935-945.
- [133] Prach, K.; Bastl, M.; Konvalinková, P.; Kovář, P.; Novák, J.; Pyšek, P.; Řehouňková, K.; Sádlo, J. Sukcese vegetace na antropogenních stanovištích v České republice – přehled dominantních druhů a stádií. *Příroda* **2008**, 26, 5-26.
- [134] Prach, K.; Řehounek, J. *Ekologie obnovy v České republice*. 2012.  
<http://ekolist.cz/cz/publicistika/nazory-akomentare/karel-prach-a-jiri-rehounek-ekologie-obnovy-v-ceske-republice> (accessed Jan.,19, 2016)
- [135] Prach, K.; Řehouňková, K. Vegetation succession over broad geographical scales: which factors determine the patterns? *Preslia* **2006**, 78, 469-480.
- [136] Priha, O.; Smolander, A. Fumigation–extraction and substrate induced respiration derived microbial biomass C, and respiration rate in limed soil of Scots pine sapling stands. *Biology and Fertility of Soils* **1994**, 17, 301-308.
- [137] Rodriguez, J.; Dendooven, L.; Alvarez, D.; Conteras, S. M. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil. *Applied Soil Ecology* **2014**, 79, 10-25.
- [138] Rohošková, M.; Penížek, V.; Borůvka, L; Study of Anthropogenic Soils on a Reclaimed Dumpsite and their Variability by Geostatistical Methods. *Soil and Water Res.*,**2006** (2), 72-78.
- [139] Řehounek, J.; Řehouňková, K.; Prach, K. (eds.). *Ekologická obnova území narušených těžbou nerostných surovin a průmyslovými deponiemi*, Calla, České Budějovice, **2010**, 172.
- [140] Sanetník, J.; Filip, J. *Meliorace*. 1. vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, 1991, 177.
- [141] Sánka, M. a Materna, J. *Indikátory kvality zemědělských a lesních půd ČR*, Planeta, 2004, 1-84.
- [142] Shrestha, R. K.; Lal, R.; Jacinthe, P. A. Enhancing carbon and nitrogen sequestration in reclaimed soils through organic amendments and chiseling. *Soil Science Society of America Journal* **2009**, 73, 1004-1011
- [143] Shrestha, R. K.; Lal, R. Carbon and nitrogen pools in reclaimed land under forest and pasture ecosystems in Ohio, USA. *Geoderma* **2010**, 157, 196-205.

- [144] Scheu, S. Changes in Microbial Nutrient Status During Secondary Succession and Its Modification by Earthworms. *Oecologia* **1990**, *84*, 351-358.
- [145] Schimel, J. P.; Schaeffer, S. M. Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*, 348.
- [146] Schüßler, A.; Schwarzott, D. and Walker, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, **2001**, *105* (12), 1413-1421.
- [147] Simpson, M. J.; Simpson, A. J. The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents. *Journal of chemical ecology* **2012**, *38* (6), 768-84.
- [148] Sofrová, D. a kol. *Biochemie – základní kurz*. Univerzita Karlova Praha, 1995, 157-180.
- [149] Speir, T. W.; Ross, D. J.; Feltham, C. W.; Orchard, V. A. and Yeates, G. W. Assessment of the feasibility of using CCA (cooper, chromium and arsenic) treated and boric-acid treated sawdust as soil amendments .2. Soil biochemical and biological properties *Plant and Soil* **1992**, *142*, 249-258.
- [150] Steinberger, Y.; Zelles, L.; Yun, Q. Y.; Lützow, M.; Munch, Ch. J. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climatic transect in the Judean Desert. *Biol Fertil Soils* **1999**, 292-294.
- [151] Šantrůčková, H. and Straškraba, M. On the relationship between specific respiration activity and microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* **1991**, *23*, 525-532.
- [152] Šimek, M.; Cooper, J. E. *Biogeochemical Cycles of Elements: An Introduction to Behaviour of the Main Mineral Nutrients of Plants and Microorganisms*. 2nd. ed., University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, **2006**, 97.
- [153] Šinko, J.: *Rekultivace pískoven*, 2010, Příroda. cz.  
<http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=1219>
- [154] Šípal, Z.; Anzenbacher, P.; Peč, P.; Pospíšil, J.; Růžička I. *Biochemie*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1992, 117-121.
- [155] Šourková, M.; Frouz, J.; Šantrůčková, H. Accumulation of carbon, nitrogen and phosphorus during soil formation on alder spoil heaps after brown-coal mining, near Sokolov (Czech Republic). *Geoderma* **2005**, *124*, 203-214.
- [156] Špiřík, F. *Racionalizace lesnických rekultivací území devastovaných báňskou činností v oblasti severočeského hnědouhelného revíru – komplexními opatřeními*. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, Praha, 1992, 29.
- [157] Šnajdr, J.; Cajthaml, T.; Valášková, V.; Merhautová, V.; Petránková, M.; Spetz, P.; Leppanen, K. and Baldrian, P. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *75*, 291-303.
- [158] Šnajdr, J., Dobiášová, P., Urbanová, M., Petránková, M., Cajthaml, T., Frouz, J., Baldrian, P. 2013 Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. *Soil Biology and Biochemistry* **2013**, *56*, 105-115.

- [159] Štursová, M. and Baldrian, P. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil*. **2011**, 338, 99-110.
- [160] Štursová, M.; Zifčáková, L.; Leigh, M. B.; Burgess, R. and Baldrian, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *Fems Microbiology Ecology* **2012**, 80, 735-746.
- [161] Štýs, S. a kol. *Rekultivace území postižených těžbou nerostných surovin* SNTL Nakladatelství technické literatury, Praha 1981, 61-126, 362-502, 607-618, 678.
- [162] Štýs, S. *Rekultivace území devastovaných těžbou nerostů*. STNL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1990, 186.
- [163] Tang, J.; Mo, Y.; Zhang, J.; Zhang, R. Influence of biological aggregating agents associated with microbial population on soil aggregate stability. *Applied Soil Ecology* **2011**, 47 (3), 153-159.
- [164] Thompson, R.; Townsend, M.; Craw, C. R.; Frew, D. R.; Riley, R. (Further) links from rocks to plants. *Trends in Ecology and Evolution* **2001**, 16(10), 543.
- [165] Tichánek, F. *Mostecké výsypky: významné refugium ohrožených druhů organismů*. <http://botanika.prf.jcu.cz/suspa/vyuka/materialy/Tichanek.pdf> (accessed May 5, 2016)
- [166] Tomášek, M. *Půdy České republiky*. Český geologický ústav, Praha, 2000, 68.
- [167] Torsvik, V.; Goksoyr, J. and Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **1990**, 56, 782-787.
- [168] Trögl, J. *Výukový materiál 8 Mikrobiální ekologie* <http://fzp.ujep.cz/~trogl/8Ekologie.pdf> (accessed May 2, 2016)
- [169] Tropek, R.; Kadlec, T.; Hejda, M.; Kočárek, P.; Skuhrovec, J.; Malenovský, I.; Vodka, I.; Spitzer, L.; Banarh, P.; Konvička, M. Technical reclamations are wasting the conservation potential of post-mining sites. A case study of black coal spoil dumps. *Ecological Engineering* **2012**, 43, 13-18.
- [170] Tunlid, A.; Hoitink, H. A. J.; Low, C.; White, D.C. Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia damping-off* in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, 55, 1368-1374.
- [171] Urbanová, M.; Kopecký, J.; Valášková, V.; Ságová-Marečková, M.; Elhottová, D.; Kyselková, M.; Moënné-Loccoz, Y.; Baldrian, P. Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. *FEMS Microbiol Ecol* **2011**, 78, 59-69.
- [172] Van Elsas, J.D.; Tam, L. et al. Microbial Interactions in Soil. In van Elsas, J. D.; Jansson, J. K. and Trevors, J. T., eds. *Modern Soil Microbiology*. CRC Press, **2006**, 177-211.
- [173] Vaněk, V.; Kolář, L.; Pavlíková, D. *Úloha organické hmoty v půdě, Racionální použití hnojiv* - sborník z konference, 2006.
- [174] Vindušková, O.; Frouz, J. Soil carbon accumulation after open-cast coal and oil shale mining in Northern Hemisphere: a quantitative review. *Environmental Earth Sciences* **2013**, 69, 1685-1698.

- [175] Vojar, J.; Doležalová, J.; Solský, M. Hnědouhelné výsypky – nová příležitost (nejen) pro obojživelníky. *Ochrana přírody* 3, **2012**, 8-11.
- [176] Volf, F. *Sukcese rostlinných společenstev a jejich význam pro rekultivace a další využití půd vzniklých při důlní činnosti v oblasti SHD Most*. Vysoká škola zemědělská, Praha, 1988, 152.
- [177] Voroney, R. P. The Soil Habitat. In Eldor, A. P. ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier **2007**, 25-49.
- [178] Vráblíková, J.; Slavík, L. *Základy pedologie a ochrany půdního fondu*. Nadace Univerzitního střediska životního prostředí při FŽP UJEP Ústí n.L., Ústí nad Labem, **1994**, 155.
- [179] Vráblíková, J.; Vráblík, P. *Aplikovaná pedologie*. Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, Ústí nad Labem, 2008, 147.
- [180] Wang, J.; Ren, H.; Yang, L.; Li D.; Guo, Q. Soil seed banks in four 22-year-old plantations in South China: Implications for restoration. *Forest ecology and management* **2000**, 258 2000-2006.
- [181] Webster, J. R. and Benfield, E. F. Vascular plant breakdown in fresh water ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1986**, 17, 567-594.
- [182] Wick, A. F.; Stahl, P. D.; Ingram, L. J.; Vicklund, L. Soil aggregation and organic carbon in short-term stockpiles. *Soil Use and Management* **2009**, 25, 311-319.
- [183] Wilkinson, S. C.; Anderson, J. M.; Scardelis, S. P.; Tisiafouli, M.; Taylor, A.; Wolters, V. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, 34, 189-200.
- [184] Wilke, B. M.; Gattinger, A.; Fröhlich, E.; Zelles, L.; Gong, P. Phospholipid fatty acid composition of a 2, 4, 6 - trinitrotoluene contaminated soil and an uncontaminated soil as affected by a humification remediation process. *Soil Biology and Biochemistry* **2004**, 725-729.
- [185] Wua, Y.; Maa, B.; Zhou, L.; Wang, H.; Xu, J.; Kemmitt, S.; Brookes, P. C. Changes in the soil microbial community structure with latitude in eastern China, based on phospholipid fatty acid analysis. *Applied Soil Ecology* **2009**, 43, 234-240.
- [186] Zbírál, J.; Malý, S.; Váňa, M. a kol. *Analýza půd III*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2011, 253.
- [187] Zelles, L.; Bai, Q. Y.; Beck, T.; Beese, F. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem. Great Britain*, **1992**, 317.
- [188] Zelles, L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **1997**, 257-294.
- [189] Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils*, **1999**, 111-120.
- [190] Zhang, D.; Dafeng, H.; Yiqi, L.; Zhou, G. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* **2008**, 1, 85-93.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. Mgr. Ing. Janu Frouzovi, Csc., za pomoc při vyhodnocování získaných dat a průběžnou konzultaci diplomové práce. Svému konzultantovi, prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D., děkuji za možnost měření na Mikrobiologickém Ústavu Akademie věd v Praze. Poděkování patří také polským kolegům z University Life Sciences v Krakowě, kteří vzorky odebrali a vyhodnotili základní chemické a fyzikální vlastnosti půd.